

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



**« ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΒΙΟΪΜΕΝΩΝ ΚΛΙΝΙΚΩΝ
ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΜΕΛΙΟΥ»**



**Προπτυχιακή εργασία της φοιτήτριας
Χιονίδου Ειρήνη**

ΛΑΡΙΣΑ 2014

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΒΙΟΫΜΕΝΩΝ ΚΛΙΝΙΚΩΝ
ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΜΕΛΙΟΥ»**

**«INVESTIGATION OF SUSPENSION OF CLINICAL BACTERIAL
STRAINS BIOFILM IN THE PRESENCE OF HONEY»**

Μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής :

- **Μόσιαλος Δημήτριος (επιβλέπων):** Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- **Μαρκουλάτος Παναγιώτης:** Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- **Καρπούζας Δημήτριος:** Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΛΑΡΙΣΑ 2014

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με το πέρας της εργασίας αυτής και τη συγγραφή της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι υποχρέωση μου να ευχαριστήσω τους ανθρώπους εκείνους οι οποίοι με βοήθησαν και συνέβαλαν, με οποιονδήποτε τρόπο, στην πραγματοποίησή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστώ τον επιβλέποντα επίκουρο Καθηγητή κύριο Μόσιαλο Δημήτριο του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε αναθέτοντάς μου την παρούσα προπτυχιακή εργασία και την πολύτιμη καθοδήγηση καθ' όλη την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Ευχαριστώ επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της επιτροπής, τον κύριο Μαρκουλάτο Παναγιώτη και τον κύριο Καρπούζα Δημήτριο.

Τέλος ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστήριου ιολογίας και μικροβιολογίας, για την βοήθειά τους στην υλοποίηση του πειράματος. Ευχαριστώ ιδιαίτερα, την υποψήφια διδάκτορα Νικολούλη Κατερίνα για τις πολύτιμες συμβουλές της και την υποστήριξή της.

<u>Περιεχόμενα</u>	<u>Σελ.</u>
Περίληψη	3
Abstract	5
1. Εισαγωγή	6
1.1 Γενικά για το μέλι - τύποι μελιού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη	6
1.1.1 Τι είναι μέλι	6
1.1.2 Διατροφική αξία μελιού	7
1.1.3 Ευεργετικές δράσεις του μελιού στον άνθρωπο	7
1.1.4 Το μέλι ως αντιμικροβιακός παράγοντας	8
1.1.5 Αντιβακτηριακή δράση	8
1.1.6 Είδη μελιού	11
1.1.6.1 Κατηγορίες μελιών	11
1.1.6.2 Ελληνικά είδη μελιού	12
Πεύκο	12
Ερείκη	13
Κουμαριά	13
Πολύκομβος	14
Μέλι ανθέων	14
Έλατο	15
Θυμάρι	15
Ηλίανθος	16
Καστανιά	16
1.1.7 Μέλι Manuka και άλλα αντιβακτηριακά μέλια	17
1.1.8 Συστατικά που περιέχονται στο μέλι	18
1.2 Τι είναι βιοϋμένας	20
1.2.1 Ορισμός και λειτουργίες του βιοϋμένα	20
1.2.2 Γιατί συγκροτούνται οι βιοϋμένες	23
1.2.3 Πώς σχηματίζονται οι βιοϋμένες;	24

1.2.4 Σχηματισμός βιοϋμένα στον χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο (<i>Staphylococcus aureus</i>)	25
1.2.4.1 Σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις και βιοϋμένας	25
1.2.4.2 Προσάρτηση σε αβιοτικές επιφάνειες	26
1.2.4.3 Σχηματισμός βιοϋμένα <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
1.3 Παθογένεια <i>Staphylococcus aureus</i> και <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
1.3.1 Παθογένεια χρυσίζοντος σταφυλόκοκκου (<i>Staphylococcus aureus</i>)	30
1.3.2 Παθογένεια <i>pseudomonas aeruginosa</i>	33
1.4 Σκοπός της παρούσας μελέτης	36
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	37
2.1. Υλικά	37
2.1.1 Δείγματα μελιών.....	37
2.2 Μέθοδοι	39
2.2.1 Προετοιμασία καλλιέργειας <i>Pseudomonas aeruginosa</i> και <i>Staphylococcus aureus</i>	39
2.2.1.1 Stock Γλυκερόλης	39
2.2.1.2 Nutrient Agar	40
2.2.1.3 α Luria Bertani Broth (LB)	40
2.2.1.3 β <i>Mueller Hinton Broth</i>	41
2.2.1.4 Αραίωση υγρής βακτηριακής καλλιέργειας και φωτομέτρηση	41
2.2.2 Δοκιμασία αναστολής σχηματισμού βιοϋμένων κλινικών βακτηριακών στελεχών παρουσία μελιού	42
2.2.2.1. Αρχή της μεθόδου	42
3. Αποτελέσματα.....	45
3.1 Δοκιμασία αναστολής σχηματισμού βιοϋμένα	45
3.1.1 Δοκιμασία αναστολής σχηματισμού βιοϋμένα του βακτηρίου <i>Staphylococcus aureus</i>	45
3.1.2 Δοκιμασία σχηματισμού βιοϋμένα του βακτηρίου <i>Pseudomonas</i>	

<i>aeruginosa</i>	46
4. Συζήτηση	49
5. Βιβλιογραφία	52

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μέλι είναι γνωστό για τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του εδώ και χιλιάδες χρόνια. Σύμφωνα με τον ορισμό του Διεθνούς Οργανισμού Γεωργίας και Τροφίμων (FAO) που περιέχεται στον Codex Alimentarius (2001) και στην οδηγία 2001/11 Ο/ΕC της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕU), «μέλι είναι το γλυκό προϊόν το οποίο παράγουν οι μέλισσες (του γένους *Apis*) καθώς αυτές συλλέγουν, μετατρέπουν, αποθέτουν, αφυδατώνουν, αποθηκεύουν στις κηρήθρες τους το νέκταρ και άλλους φυτικούς χυμούς από διάφορα ζωντανά μέρη του φυτού, προκειμένου να ωριμάσει».

Στις μέρες μας, όλα τα φυσικά προϊόντα, δηλαδή τα προϊόντα που δεν έχουν υποστεί καμία επεξεργασία, συγκεντρώνουν την προσοχή του ιατρικού κόσμου, καθώς η μη αποτελεσματική αντιμετώπιση πολλών λοιμώξεων αυξάνεται εκθετικά με την εξάπλωση βακτηριακών στελεχών ανθεκτικών σε πολλά αντιβιοτικά. Αυτό έχει οδηγήσει στην επανεξέταση παλαιότερων εναλλακτικών θεραπειών, όπως είναι αυτό του μελιού.

Στην παρούσα διπλωματική μελέτη, ελληνικά δείγματα μελιών διαφορετικής βοτανικής προέλευσης, εκτιμήθηκαν για την ικανότητά τους να αναστέλλουν την δημιουργία βιοϋμένα του gram θετικού βακτηρίου *Staphylococcus aureus* και του gram αρνητικού βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*. Δείγματα μελιού συγκρίθηκαν, για την δράση τους ως ανασταλτικά δημιουργίας βιοϋμένα στα βακτηριακά στελέχη, με το μέλι manuka, γνωστό για την ισχυρή αντιμικροβιακή του δράση και ένα συνθετικό μέλι, που φτιάχτηκε στο εργαστήριο.

Οι βιοϋμένες αποτελούν μια εξωκυτταρική πολυμερική μήτρα ή πλέγμα, όπου τα βακτήρια προτιμούν να ζουν σε αυτή και προστατεύονται από περιβαλλοντικές πιέσεις, την αντιμικροβιακή θεραπεία και το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Έχει αναφερθεί πως δρουν ως ένα φράγμα διάχυσης, για να επιβραδύνουν τη διείσδυση ορισμένων αντιμικροβιακών παραγόντων, με αποτέλεσμα τα βακτηριακά στελέχη να είναι λιγότερο επιρρεπή σε αντιμικροβιακούς παράγοντες και έχουν μειωμένη ευαισθησία σε αναστολείς, αυξάνοντας έτσι την επιβίωσή τους.

Με το πέρας της παρούσας διπλωματικής μελέτης, παρατηρήσαμε πως γενικά στα δείγματα μελιού που συνολικά ήταν 15, η αναστολή βιοϋμένα είναι μεγαλύτερη στην *Pseudomonas aeruginosa* σε σχέση με τον *Staphylococcus aureus*, εκτός από το δείγμα N26 στις συγκεντρώσεις 3,125% v/v και 1,56% v/v, το δείγμα N22 στην συγκέντρωση 1,56% v/v, το δείγμα N14 στην συγκέντρωση 0,78% v/v, το δείγμα N12 στην συγκέντρωση 1,56% v/v και το δείγμα N10 στην συγκέντρωση 6,25% v/v που συμβαίνει το αντίθετο. Επίσης, τα

ελληνικά μέλια N:1,2,5,15,19,22 εμφάνιζαν μεγαλύτερη αναστολή σε σχέση με το μέλι αναφοράς Manuka της *Pseudomonas aeruginosa*. Ταυτόχρονα, και τα 14 δείγματα μελιού εκτός του N5 εμφανίζουν μεγαλύτερη αναστολή δημιουργίας βιοϋμένα σε σχέση με το μέλι αναφοράς Manuka του *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Honey is known for its antimicrobial properties for thousands of years. According to the definition of the International Food and Agriculture Organization (FAO) contained in the Codex Alimentarius (2001) and 2001/11 O/EC Directive of the European Union (EU), "Honey is the natural sweet substance, produced by *Apis mellifera* bees from the nectar of plants or from secretions of living parts of plants, or excretions of plant-sucking insects on the living parts of plants, which the bees collect, transform by combining with specific substances of their own, deposit, dehydrate, store and leave in honeycombs to ripen and mature".

Nowadays, all natural products means the products that have not undergone any treatment, draw the attention of the medical world as ineffective treatment of many infections increases exponentially, because of the spread of bacterial strains resistant to many antibiotics. This has resulted in the review of earlier alternative therapies such as that of honey.

In this thesis, Greek honey samples of different botanical origin were evaluated for their ability to inhibit biofilm creation of gram positive bacterium *Staphylococcus aureus* and gram negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. Honey samples were compared for their inhibitory effect in the creation of bacterial strains biofilm, with manuka honey, known for its strong antimicrobial activity and a synthetic honey, that was made in the laboratory.

The biofilm forms an extracellular polymer matrix or grid, wherein the bacteria prefer to live and protect themselves from environmental stresses, antimicrobial treatment and the host immune system. It has been reported to act as a diffusion barrier to retard the penetration of certain antimicrobials, resulting in bacterial strains that are less susceptible to antimicrobial agents and have reduced sensitivity to inhibitors, thus increasing their survival.

Upon completion of this thesis, we observed that in general, in the samples of honey (15 in total), the biofilm inhibition is greater in *Pseudomonas aeruginosa* in relation to *Staphylococcus aureus*. The samples N26 in 3,125% v/v and 1.56 % v/v concentrations, N22 in 1,56% v/v concentration, N14 in 0,78% v/v concentration, N12 in 1,56% v/v concentration and N10 in 6,25% v/v concentration (in particular, N10 shows the opposite action) are excluded. Also, the Greek honeys N: 1,2,5,15,19,22 showed greater inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* compared with the reference Manuka honey. At the same time, all 14 honey samples except N5 exhibit greater inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm creation compared with Manuka reference honey.

1. Εισαγωγή

1.1 Γενικά για το μέλι – τύποι μελιού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

1.1.1 Τι είναι μέλι

Σύμφωνα με τον ορισμό του Διεθνούς Οργανισμού Γεωργίας και Τροφίμων (FAO) που περιέχεται στον Codex Alimentarius (2001) και στην οδηγία 2001/11 O/EC της Ευρωπαϊκής Ένωσης (EU), «μέλι είναι το γλυκό προϊόν το οποίο παράγουν οι μέλισσες (του γένους *Apis*), καθώς αυτές συλλέγουν, μετατρέπουν και αποθηκεύουν στις κηρήθρες τους το νέκταρ και άλλους φυτικούς χυμούς από διάφορα ζωντανά μέρη του φυτού».

Το μέλι χρησιμεύει στις μέλισσες ως απόθεμα θερμίδων, όταν δε μπορούν να τραφούν από τα φυτά, λόγω αντίξωων καιρικών συνθηκών (συνεχείς βροχές ή ξηρασία κατά τη βλαστική περίοδο ή χαμηλές θερμοκρασίες το χειμώνα). Για όσο διάστημα του έτους τα φυτά εξακολουθούν να προσφέρουν νέκταρ ή μελίτωμα, οι μέλισσες τρέφονται απ' ευθείας από αυτούς τους ακατέργαστους φυτικούς χυμούς. Η διαδικασία της μετατροπής του νέκταρος σε μέλι ξεκινά στον πρόλοβο της μέλισσας, με την προσθήκη ενζύμων από τους σιελογόνους και υποφαρυγγικούς αδένες. Οι υποφαρυγγικοί αδένες βρίσκονται στο πάνω μέρος του κεφαλιού της μέλισσας και έχουν σχήμα λεπτού αγωγού με πολλές διακλαδώσεις. Είναι πολύ ανεπτυγμένοι στη νεαρή εργάτρια και παράγουν το βασιλικό πολτό. Στις μεγαλύτερης ηλικίας εργάτριες συρρικνώνονται και αλλάζουν λειτουργία: παράγουν το ένζυμο ιμπερτάση, που είναι απαραίτητο για τη μετατροπή του νέκταρος σε μέλι και το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης, που μετατρέπει τη γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ.

Ο μεταβολισμός του φυτικού χυμού προκειμένου να γίνει αυτό που εμείς ονομάζουμε μέλι, είναι η χημική αποδόμηση του δισακχαρίτη σουκρόζη (πρόκειται για την κοινή ζάχαρη), στα μονοσάκχαρα της γλυκόζης και φρουκτόζης, που έχουν την ιδιότητα να αφομοιώνονται άμεσα. Ακολουθεί και ανασύνθεση δι- και τριζαχαριτών, αλλά είναι ποσοτικά πολύ περιορισμένη. Οι αρωματικές (διάφορα τερπένια) και οι χρωστικές ουσίες που περιέχονται στον φυτικό χυμό δεν μεταβολίζονται, ενώ το μέλι εμπλουτίζεται ακόμη περισσότερο με το άρωμα των οργανικών οξέων από τη διάσπαση της γλυκόζης. Επίσης προστίθενται ένζυμα από τους αδένες της εργάτριας μέλισσας, τα οποία μεταβολίζουν τα σάκχαρα. Τέλος, τα διάφορα μεταλλικά στοιχεία του μελιού παραμένουν ακριβώς τα ίδια με αυτά που περιέχονται στον πρωτογενή φυτικό χυμό.

Ο μεταβολισμός των σακχάρων του νέκταρος και του μελιτώματος συνεχίζεται και ολοκληρώνεται μέσα στα κελιά των κηρηθρών. Η ικανότητα των μελισσών να μετατρέπουν το ευαίσθητο σε ζυμώσεις (και επομένως σε αλλοιώσεις) νέκταρ και αντίστοιχα το μελίτωμα, στο εξαιρετικά συντηρήσιμο μέλι, αποτελεί βασικό μηχανισμό προσαρμογής, ο οποίος διασφαλίζει την επιβίωση τους (Anthimidou and Mossialos, 2013).

1.1.2 Διατροφική αξία μελιού

Το μέλι αποτελείται 70-80% από σάκχαρα, κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη και έχει μεγάλη θρεπτική αξία, αφού απορροφάται άμεσα από τον ανθρώπινο οργανισμό (1 κουταλιά της σούπας μέλι αποδίδει στον οργανισμό 64Kcal). Έχουν αναγνωρισθεί πάνω από 180 διαφορετικές ουσίες στο μέλι, οι οποίες το καθιστούν πολύτιμη τροφή. Περιέχει νερό σε ποσοστό 16%, οργανικά οξέα (δεκαοκτώ τον αριθμό), πρωτεΐνες και αμινοξέα, μεταλλικά στοιχεία σε μικρές ποσότητες (κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο, σίδηρο κ.ά.), ένζυμα, συμπλέγματα πρωτεϊνών, βιταμίνες (B2, B6, C, D, E, παντοθενικό οξύ, φολικό οξύ κ.α.), φυσικές αρωματικές ουσίες κ.α. Τα ανόργανα στοιχεία του μελιού συμμετέχουν σε διάφορα ενζυμικά συστήματα, παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό και δρουν στον ανθρώπινο οργανισμό.



Εικόνα 1.

1.1.3 Ευεργετικές δράσεις του μελιού στον άνθρωπο

Ορισμένες από τις ευεργετικές δράσεις του μελιού στον ανθρώπινο οργανισμό (Herold 1970), είναι:

- Είναι δυναμωτικό,
- επιδρά στην καρδιά,
- στο ήπαρ,
- στο πεπτικό σύστημα,
- συμβάλλει στην επούλωση τραυμάτων,
- έχει αντιφλεγμονώδη δράση,
- αντιοξειδωτική δράση,

- υποβοηθά το ανοσοποιητικό σύστημα (Anthimidou and Mossialos, 2013).

Στο μέλι βρέθηκαν ουσίες όπως η α-τοκοφερόλη (βιταμίνη Ε), το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), η β-καροτίνη (βιταμίνη Α), ουσίες με ιδιαίτερα ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Επίσης ανιχνεύτηκαν και ένζυμα με αντιοξειδωτική δράση, όπως η καταλάση και η υπεροξειδάση. Τα ένζυμα αυτά χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα το υπεροξείδιο του υδρογόνου και το μετατρέπουν σε αβλαβή προϊόντα. Ωστόσο, πολλοί επιστήμονες αναφέρουν ότι η αντιοξειδωτική δράση του μελιού οφείλεται κυρίως στις φαινολικές ουσίες που περιέχονται σε αυτό (Σάρδαλου και συν., 2002).

1.1.4 Το μέλι ως αντιμικροβιακός παράγοντας

Για πολλές εκατοντάδες χρόνια το μέλι χρησιμοποιούνταν για θεραπεία πληγών, καθώς και ως θεραπεία παθήσεων του γαστρεντερικού συστήματος (Zumla and Lulat, 1989). Το μέλι έχει ευρύ φάσμα δράσης κατά παθογόνων μικροοργανισμών και βακτηρίων που προσβάλλουν τον άνθρωπο και τα τρόφιμα (Cooper et al., 2002; Kwakman et al., 2008; Mundo et al., 2004). Η ισχυρή *in vitro* δράση του μελιού έναντι βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά και η επιτυχής εφαρμογή του στη θεραπεία χρόνιων μολυσμένων πληγών που δεν ανταποκρίνονται στην αντιβιοτική θεραπεία, προσέελκυσε το ενδιαφέρον της ιατρικής για το μέλι ως εναλλακτική θεραπεία.

Πρόσφατα αναγνωρίστηκε η ισχυρή αντιβακτηριακή του δράση, καθώς και η ικανότητά του να παρεμποδίζει την ανάπτυξη βακτηρίων σε μολυσμένες πληγές, καθώς και να τις καθαρίζει. Έρευνες (Cooper et al., 2002) δείχνουν ότι το μέλι είναι αποτελεσματικό *in vitro* ενάντια σε βακτήρια που μολύνουν πληγές, συμπεριλαμβανομένων των *E.coli*, *S.aureus* και άλλων. Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού οφείλεται κυρίως στην ενζυμική παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου, μέσω του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης, της οξύτητάς του και της ώσμωσής του. Επιπρόσθετα, συστατικά του μελιού όπως αρωματικά οξέα ή φαινολικές ενώσεις και πρωτεΐνες, συνεισφέρουν στη συνολική αντιμικροβιακή δραστηριότητα.

1.1.5 Αντιβακτηριακή δράση

Είναι η πλέον επιστημονικά τεκμηριωμένη βιολογική δράση του μελιού.

Η θεραπευτική και φαρμακευτική ικανότητα του μελιού που από τα πανάρχαια χρόνια αλλά ακόμη και σήμερα χρησιμοποιείται στην «παραδοσιακή» ιατρική, μπορεί να αποδοθεί στην αντιβακτηριακή του δράση. Η αντιβακτηριακή συμπεριφορά ενός μελιού εξαρτάται από το είδος του και από τη συγκέντρωσή του και μπορεί να είναι είτε βακτηριοστατική, είτε

βακτηριοκτόνος. Ορισμένα είδη μελιού στις πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις καθυστερούν την ανάπτυξη του βακτηρίου, καθώς όμως αυξάνεται βαθμιαία η συγκέντρωσή τους αναστέλλουν την ανάπτυξή του (βακτηριοστατική δράση) και στις πολύ υψηλές συγκεντρώσεις το θανατώνουν (βακτηριοκτόνος δράση). Άλλα είδη μελιού, καθώς αυξάνεται βαθμιαία η συγκέντρωσή τους, φθάνουν σε ένα ορισμένο επίπεδο συγκέντρωσης όπου αναστέλλουν την ανάπτυξη του βακτηρίου, χωρίς όμως να θανατώνουν το βακτήριο (βακτηριοστατική δράση).

Η αντιβακτηριακή δράση του μελιού παλαιότερα αποδόθηκε στην υψηλή οσμωτική του δράση, στην σχετικά υψηλή οξύτητά του (pH 3,2 έως 5,5) αλλά και στο H_2O_2 . Ωστόσο, σύγχρονα πειραματικά δεδομένα αποδίδουν τη αντιμικροβιακή του δράση κυρίως σε άλλους παράγοντες, όπως π.χ. στα φυτοχημικά του συστατικά (φαινολικά οξέα, πτητικές ουσίες, φλαβονοειδή, κ.ά.). Οπωσδήποτε, το μέλι ως υπέρκορο διάλυμα σακχάρων, μειώνει την ενεργότητα νερού σε επίπεδα χαμηλότερα από αυτά που απαιτούνται για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

Ωστόσο, σε πολλές εργασίες όπου η αντιβακτηριακή δράση του μελιού συγκρίθηκε με αυτή τεχνητού μελιού, βρέθηκε ότι αυτή η δράση οφειλόταν σ' άλλους πιο σημαντικούς παράγοντες. Το H_2O_2 για πολλά χρόνια θεωρείτο ως ο κύριος ανασταλτικός παράγοντας του μελιού στην ανάπτυξη των βακτηρίων. Μάλιστα το είχαν ονομάσει ως "inhibine" (σε μια άτυπη ερμηνεία: «ανασταλτίνη»). Το H_2O_2 , παράγεται από τη δράση του ενζύμου γλυκοζοοξειδάση (το ένζυμο αυτό παράγεται από τους υποφαρυγγικούς αδένες της μέλισσας), το οποίο διασπά τη γλυκόζη σύμφωνα με την αντίδραση $γλυκόζη \rightarrow H_2O_2 + γλυκολακτόνη$. Ωστόσο, η παρουσία στο μέλι του ενζύμου καταλάση που διασπά με πολύ μεγάλη ταχύτητα το υπεροξείδιο του H, θέτει σε αμφισβήτηση την παραπάνω παραδοχή (Σάρδαλου και συν., 2002).

- Πρωτεύοντα ρόλο παίζουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου και το γλυκονικό οξύ. Το δεύτερο είναι το κυρίαρχο ποσοτικά, μεταξύ 18 οξέων στο μέλι. Όταν το νέκταρ συλλέγεται από τη μέλισσα, αυτό έχει ουδέτερο pH. Η συλλέκτρια μέλισσα του προσθέτει το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης από τους υποφαρυγγικούς της αδένες, με αποτέλεσμα η γλυκόζη να μετατρέπεται σε γλυκονικό οξύ. Ως παραπροϊόν της βιοχημικής αντίδρασης σχηματίζεται το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Αυτά τα δυο συστατικά του μελιού, εμποδίζουν την ανάπτυξη των περισσότερων βακτηρίων στη μάζα του. Το H_2O_2 όχι μόνο αναχαιτίζει την ανάπτυξη των βακτηρίων, αλλά και τα θανατώνει. Το H_2O_2 σε μικρές συγκεντρώσεις βρέθηκε επίσης ότι συμμετέχει στους αυξητικούς παράγοντες που συμβάλλουν στην επούλωση πληγών, όταν σε αυτές εφαρμόζονται επιθέματα με μέλι.

Το μέλι περιέχει και καταλάση, ένζυμο το οποίο ανήκει στις λειτουργικές πρωτεΐνες και

επιταχύνει την αντίδραση διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου: $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$. Η μετατροπή αυτή είναι αναγκαία για να μην καταστραφεί το κύτταρο, γιατί το H_2O_2 που παράγεται κατά τις αντιδράσεις μεταβολισμού είναι ιδιαίτερα τοξικό. Στα θηλαστικά η καταλάση βρίσκεται κυρίως στα κύτταρα του ήπατος και των νεφρών. Η καταλάση βρίσκεται επίσης σε φυτικά κύτταρα της γύρης και του νέκταρος, γι' αυτό ανιχνεύεται και στο μέλι. Τα επίπεδα του H_2O_2 στο μέλι καθορίζονται από τα επίπεδα οξειδάσης της γλυκόζης (η οποία το παράγει) και της καταλάσης (η οποία το διασπά) (Weston, 2000). Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις του H_2O_2 σε διαφορετικά μέλια (από διαφορετικές φυτικές πηγές), έχουν ως αποτέλεσμα τις διαφορές στην αντιμικροβιακή δράση των μελιών.

- Ο δεύτερος παράγοντας που παίζει ρόλο στην αντιμικροβιακή δράση του μελιού είναι η μεγάλη συγκέντρωση σακχάρων. Υπάρχουν πολλά σάκχαρα στο μέλι, τόσα ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο όρος «υπέρκορο διάλυμα», που σημαίνει ότι περιέχει σάκχαρα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από εκείνες οι οποίες μπορούν κανονικά να περιέχονται στην υγρή φάση του. Αυτά δίνουν την χαρακτηριστική γεύση, αλλά περιορίζουν την ποσότητα του νερού. Χαρακτηριστικό είναι ότι, όταν τοποθετηθεί μέλι σε μια πληγή, συμπεριφέρεται σαν σφουγγάρι και απορροφά όλη την περίσσια νερού που υπάρχει. Αυτό είναι μια μορφή ωσμωτικού φαινομένου. Λόγω της όσμωσης, το μέλι απορροφά όλα τα υγρά από τη μολυσμένη πληγή. Τα βακτήρια, τα οποία χρειάζονται τα υγρά για να μπορέσουν να αναπτυχθούν, δεν βρίσκουν πια αποθέματα και αυτό βοηθάει στο να σκοτωθούν.

- Άλλος παράγοντας που σχετίζεται με την αντιμικροβιακή δράση του μελιού είναι η οξύτητά του. Το pH του κυμαίνεται μεταξύ 3 και 4 (περίπου το ίδιο με τον χυμό πορτοκαλιού). Αυτό το περιβάλλον θεωρείται ως όξινο, στο οποίο τα βακτήρια σκοτώνονται. Αν το μέλι αραιωθεί (για παράδειγμα με την απελευθέρωση υγρών του σώματος σε μια πληγή), ίσως μειωθεί η οξύτητά του, αφήνοντας τα βακτήρια να αναπτυχθούν ξανά.

- Τέλος, το μέλι περιέχει φυτοχημικά (π.χ. μεθυλγλυοξάλη, MGO) (Mavric et al., 2008), φαινολικά οξέα, λυσοζύμη, φλαβονοειδή, πρωτεΐνες και ολιγοπεπτίδια (που παράγονται ενδεχομένως από τα γηγενή βακτήρια στα στομάχια των μελισσών πριν την ωρίμανση του μελιού) (Mundo et al., 2004), που φαίνεται ότι παίζουν ρόλο στην αντιβακτηριδιακή του δράση. Η bee-defensin-1 είναι μια πρωτεΐνη η οποία εκκρίνεται στο μέλι από τους υποφαρυγγικούς αδένες της εργάτριας μέλισσας (Kwakman et al., 2010). Οι εκκρίσεις των υποφαρυγγικών αδένων χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του βασιλικού πολτού και του μελιού. Η ποσότητα της bee-defensin-1 στον βασιλικό πολτό (εκεί αναφέρεται ως «ρογιαλισίνη» που λαμβάνεται από διαφορετικά μελίσσια), ποικίλει έντονα, ενώ ορισμένα δείγματα δεν έχουν αυτό το πεπτίδιο. Αυτό δείχνει ότι υπάρχει μεγάλη

διακύμανση στην έκφραση της bee-defensin-1 από τους υποφαρυγγικούς αδένες. Αυτό μπορεί επίσης να εξηγήσει τη διαφορά στα επίπεδα της bee-defensin-1 σε διαφορετικά μέλια.

Η πρωτεΐνωση K (αναφέρεται επίσης ως πρωτεάση K ή ενδοπεπτιδάση K), είναι μια πρωτεΐνη σερίνης ευρέως φάσματος. Απομονώθηκε από το σαπροφυτικό μύκητα *Tritirachium album*. Η πρωτεΐνωση K είναι ικανή να πέπτει την κερατίνη (δομικό στοιχείο της τρίχας), γι' αυτό ονομάζεται «πρωτεΐνωση K». Η πρωτεΐνωση K δρα στον πεπτιδικό δεσμό, δίπλα στην καρβοξυλική ομάδα των αλειφατικών και αρωματικών αμινοξέων. Ένα ειδικό χαρακτηριστικό γνώρισμα της πρωτεΐνωσης K είναι η ικανότητα της να πέπτει ατόφιες πρωτεΐνες. Με αυτό τον τρόπο αδρανοποιεί ένζυμα, όπως DNAάσες και RNAάσες, χωρίς να τις αλλοιώνει.

1.1.6 Είδη μελιού

1.1.6.1 Κατηγορίες μελιών

Υπάρχουν 2 κατηγορίες μελιού. Το ανθόμελο, που παράγεται από το νέκταρ των λουλουδιών, και το μέλι των μελιτωμάτων που παράγεται από το χυμό του πεύκου, της ελάτης και άλλων δασικών φυτών.

Ειδικά για το μέλι μελιτωμάτων, καθώς πολλοί δεν γνωρίζουν με σαφήνεια την προέλευσή του, διευκρινίζεται ο τρόπος παραγωγής του στο φυσικό περιβάλλον: οι εδαφοκλιματολογικές συνθήκες της Ελλάδας ευνοούν την ανάπτυξη του εντόμου *Marchalina hellenica* (κοινώς βαμβακάδα, ή εργάτης), το οποίο παρασιτεί στα πεύκα και εκκρίνει μελίτωμα. Οι μελιτώδεις εκκρίσεις συλλέγονται, μεταποιούνται από τις μέλισσες και αποθηκεύονται ως μέλι. Η μεγαλύτερη παραγωγή μελιού στην Ελλάδα (περίπου 60-65%) προέρχεται από τις μελιτώδεις εκκρίσεις του «εργάτη» και το μέλι που παράγεται είναι γνωστό ως πευκόμελο.

Η περίοδος που παράγονται οι μελιτώδεις εκκρίσεις είναι σταθερή κάθε χρόνο και μπορεί να προβλεφθεί με σχετική ακρίβεια. Όσο μικρότερος σε μέγεθος είναι ο εργάτης, τόσο μικρότερη ποσότητα τροφών λαμβάνει και τόσο λιγότερα μελιτώματα παράγει. Στην περίοδο των αλλαγών του δέρματος (εκδύσεων), καθώς επίσης και όταν ενηλικιωθεί, το έντομο δεν τρέφεται και δεν παράγει μελίτωμα.

Υψηλές θερμοκρασίες και μεγάλη ξηρασία έχουν ως αποτέλεσμα να λιγοστεύουν τα μελιτώματα, ενώ αντίθετα μέτριες θερμοκρασίες με δροσερό καιρό ευνοούν την κυκλοφορία των χυμών του πεύκου και την άφθονη παραγωγή μελιτοεκκρίσεων.

Ο εργάτης αποβάλλει περισσότερες μελιτοεκκρίσεις, όταν παρασιτεί στην τραχεία (*Pinus brutia* Ten.), παρά στη χαλέπιο πεύκη (*Pinus halepensis* Miller) (Anthimidou and

Mossialos, 2013).

1.1.6.2 Ελληνικά είδη μελιού

Τα διάφορα είδη μελιού διακρίνονται ανάλογα με το φυτό από όπου άντλησαν οι μέλισσες το νέκταρ (θυμαρίσιο, ελάτου, ανθέων), από την περιοχή προέλευσης και τον τρόπο παραλαβής του από τις κηρήθρες.

Το χρώμα του μελιού ποικίλλει από σχεδόν άχρωμο έως καφέ σκούρο. Ως προς τη σύσταση, μπορεί να είναι ρευστό, παχύρρευστο ή μη, μερικά ή ολικά κρυσταλλωμένο. Η γεύση και το άρωμα ποικίλουν, αλλά εξαρτώνται από τη φυτική προέλευση.

Κάθε κατηγορία έχει τις εξής ιδιομορφίες που την κάνει να ξεχωρίζει απ' όλες τις άλλες:



Εικόνα 2. Πεύκο

Πεύκο – *Pinus halepensis* (κοινό πεύκο), (μελίτωμα), αλλά και *P. sylvestris*, *P. pinea*. Τα κυριότερα πευκοδάση που εποικίζονται από τον εργάτη και επομένως έχουν μεγάλη παραγωγή μελιτωμάτων, βρίσκονται σε περιοχές όπως η Εύβοια, η Σκόπελος, η Σκιάθος, η Θάσος, η Ζάκυνθος, το Ρέθυμνο, η Ρόδος και η Χαλκιδική. Το 65% περίπου της συνολικής παραγωγής μελιού στην Ελλάδα, είναι πευκόμελο (Θρασυβούλου και συν., 2002). Δεν είναι ιδιαίτερα γλυκό και κρυσταλλώνει αργά, αφού η φυσική περιεκτικότητά του σε γλυκόζη είναι χαμηλή. Είναι πλουσιότερο από το ανθόμελο σε ιχνοστοιχεία (ασβέστιο, το μαγνήσιο, ο ψευδάργυρος, ο σίδηρος, ο χαλκός κ.α.), σε πρωτεΐνες και αμινοξέα. Επίσης έχει τις λιγότερες θερμίδες. Το ανοιξιάτικο πευκόμελο διαφέρει στα οργανοληπτικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά από το φθινοπωρινό πευκόμελο (Γούναρη, 2013· Anthimidou and Mossialos, 2013).



Εικόνα 3. Ερείκη.

Ερείκη - *Erica multipolyflora*, φθινοπωρινή ερείκη (ευρέως γνωστή και ως σουσούρα), (νέκταρ), αλλά και *E. arborea*, *E. manipuliflora*, *E. herbacea*. Θεωρείται ότι είναι προϊόν με υψηλή θρεπτική αξία, γι' αυτό και διατίθεται κυρίως από καταστήματα Υγιεινής Διατροφής. Έχει οσμή και γεύση χαρακτηριστική που αρέσει ιδιαίτερα σε απαιτητικούς καταναλωτές. Μέλι με υψηλή θρεπτική αξία, λιγότερο πλούσιο σε ιχνοστοιχεία σε σχέση με τα μέλια καστανιάς ή βελανιδιάς. Έχει την ικανότητα να ρίχνει την χοληστερίνη. Κρυσταλλώνεται γρήγορα, σε έναν με τρεις μήνες, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε γλυκόζη. Είναι σκοτεινόχρωμο, έως και κοκκινωπό, ιδίως μετά την κρυστάλλωσή του (Μυγδανάλευρος, 2013· Anthimidou and Mossialos, 2013).



Εικόνα 4. Κουμαριά.

Κουμαριά - *Arbutus unedo* (νέκταρ). Θάμνος που απαντάται σχεδόν σε όλη τη χώρα. Η ανθοφορία του δέντρου παρατηρείται από τον Οκτώβριο μέχρι τις αρχές του Δεκέμβρη. Λόγω προχωρημένης εποχής (φθινόπωρο) κατά την οποία αποθηκεύεται στις κηρήθρες, το μέλι κουμαριάς έχει υψηλά ποσοστά υγρασίας και μεγάλη φυσική περιεκτικότητα σε ζύμες, με αποτέλεσμα ορισμένες φορές να έχει ξινή (ή κατά άλλους, πικρή) γεύση. Το μέλι αυτό παρότι θεωρείται μη εμπορικό, είναι πολύ θρεπτικό. Έχει ευχάριστο άρωμα και χρώμα πολύ σκούρο, σχεδόν μαύρο (Μυγδανάλευρος, 2014· Anthimidou and Mossialos, 2013).



Εικόνα 5. Πολύκομβος.

Πολύκομβος – *Polygonum spp* (νέκταρ). Σκοτεινόχρωμο μέλι με χαρακτηριστική μυρωδιά. Η γεύση του δεν αρέσει ιδιαίτερα και γι' αυτό δεν συναντάται ως αμιγές μέλι στην ελληνική αγορά. Είναι από τα πιο πλούσια σε ένζυμα μέλια που υπάρχουν, περιέχει μεταλλικά στοιχεία σε υψηλά ποσοστά, που του προσδίδουν υψηλή θρεπτική αξία και είναι αρκετά ανθεκτικό στη θέρμανση.



Εικόνα 6. Μέλι ανθέων.

Μέλι ανθέων (νέκταρ) ή ανθόμελο. Μέλι που παράγεται την άνοιξη με την ανθοφορία της ελληνικής φύσης. Είναι ανάμεικτο μέλι και οι ιδιότητές του διαφέρουν ανάλογα με το νέκταρ των ελληνικών φυτών που μεταφέρουν στην κυψέλη οι μέλισσες (όπως πορτοκαλιάς, θυμαριού, ευκαλύπτου, δενδρολίβανου, λεβάντας, λυγαριάς, ακακίας κ.ά.). Παράγεται σε μεγάλες ποσότητες και μαζί με το πευκόμελο υπερβαίνουν το 80% του ποσοστού της συνολικής ελληνικής παραγωγής. Το μειονέκτημα είναι ότι δε μπορούν να οριστούν με σαφήνεια τα χαρακτηριστικά που συνδέονται με την ποιότητά του, γιατί δεν έχει διακριτά στοιχεία, ενώ πολλοί μελισσοκόμοι και τυποποιητές το αναμειγνύουν με διάφορα μέλια τα οποία είναι ταυτοποιημένα -π.χ. βαμβακιού- αλλά χωρίς να το αναφέρουν στη συσκευασία. Είναι συνήθως ανοιχτόχρωμο και η κρυστάλλωσή του, αν και είναι δύσκολο να προβλεφθεί, γίνεται συνήθως 4-6 μήνες μετά τη συλλογή του (Χήνου, 2006ˆ Anthimidou and Mossialos, 2013).



Εικόνα 7. Έλατο.

Έλατο – *Abies sp* (μελίτωμα). Στα ελληνικά είδη ελάτης, το σημαντικότερο κοκκοειδές που παρασιτεί είναι το *P. Hemicryphus*, που παράγει μελιτώδεις εκκρίσεις, εκμεταλλεύσιμες από τις μέλισσες. Αυτές δίνουν μέλι εξαιρετικής ποιότητας. Η έκκριση του μελιτώματος ευνοείται από τις υψηλές θερμοκρασίες και τις συνθήκες ξηρασίας. Έτσι η μεγαλύτερη παραγωγή σημειώνεται τους μήνες Μάιο και Ιούνιο. Το μέλι διαφοροποιείται ανάλογα με το είδος της ελάτης. Το ελληνικό έλατο, γνωστό ως ελάτη η Κεφαλληνική (*Abies cephalonica*), απαντάται μόνο στην Ελλάδα και ειδικότερα στην Ευρυτανία, τον Ταΰγετο, το Περούλι, την Πάρνηθα, τον Χελμό της Πελοποννήσου και άλλες περιοχές. Ένα από αυτά παράγει μέλι που είναι γνωστό ως βανίλια, χάρη στις κρεμώδεις ανταύγειες που δημιουργούνται στο εσωτερικό του. Είναι εξαιρετικά πυκνόρευστο, δεν κρυσταλλώνει, παρουσιάζει αναλαμπές χρωμάτων και έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε ανάγοντα ζάχαρα. Παράγεται στο Μαίναλο ή στον Πάρνωνα της Πελοποννήσου. Αυτό του Μαινάλου είναι το μοναδικό ελληνικό μέλι που έχει χαρακτηριστεί στην Ευρωπαϊκή Ένωση ως Π.Ο.Π. Το δεύτερο είδος μοιάζει με το συνηθισμένο μέλι που παράγεται από την ευρωπαϊκή ελάτη (*Abies alba*), γνωστό ως δασόμελο.



Εικόνα 8. Έλατο.

Θυμάρι – *Thymus sp* (νέκταρ). Στην Ελλάδα απαντάται το είδος *Thymus serpyllus* στη βορειοηπειρωτική Ελλάδα, μέχρι τη Θεσσαλία και την Εύβοια. Επίσης, υπάρχει το είδος που είναι γνωστό ως θρουμπί (*Thymus capitatus*), που επίσης ονομάζεται θυμάρι. Είναι ένα από τα σπουδαιότερα μελισσοκομικά φυτά για τη χώρα μας, γιατί το μέλι που παράγεται είναι

άριστης ποιότητας, με εξίσου πολύ καλή εμφάνιση, που αποτελεί εμπορικό πλεονέκτημα. Το θυμαρίσιο μέλι είναι τονωτικό, έχει αντισηπτικές ιδιότητες, αυξάνει την ενεργητικότητα και τις φυσικές δυνάμεις του ανθρώπου. Έχει ευχάριστη γεύση, αλλά ορισμένες φορές αφήνει μία αίσθηση «καψίματος» λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σε φρουκτόζη. Έχει έντονο άρωμα, χαρακτηριστικό ανοικτό χρώμα, και κρυσταλλώνει σε διάστημα 6-18 μηνών, ανάλογα με τον αμιγή του χαρακτήρα. Η παραγωγή του ανέρχεται περίπου σε ποσοστό 10% της συνολικής παραγωγής μελιού στην Ελλάδα.



Εικόνα 9. Ηλίανθος.

Ηλίανθος - *Helianthus annuus* (νέκταρ). Είναι ανοιχτόχρωμο μέλι που κρυσταλλώνει σε έναν με δύο μήνες. Στην κρυσταλλική του μορφή είναι κιτρινωπό. Κατά κύριο λόγο συλλέγεται στον Έβρο, όπου υπάρχουν εκτάσεις με το συγκεκριμένο καλλιεργούμενο φυτό. Είναι ανοιχτόχρωμο προς κιτρινωπό, εξαιρετικά παχύρρευστο, κρυσταλλώνει σε 1-2 μήνες και έχει διακριτικό άρωμα. Είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στη ποιότητα της διατροφής μας (Θρασυβούλου και συν., 2002· Anthimidou and Mossialos, 2013).



Εικόνα 10. Καστανιά.

Καστανιά - *Castanea sativa*. Το μέλι που συλλέγεται από την καστανιά είναι εξαιρετικής ποιότητας, το χρώμα του ποικίλει ανάλογα με την προέλευσή του, από ανοιχτό καφετί μέχρι σκούρο, είναι έντονα αρωματικό και αρκετά ανθεκτικό στη θέρμανση. Είναι αρκετά διαδεδομένο στα ορεινά μέρη της Ελλάδας και κυρίως παράγεται στη χερσόνησο του Αγίου Όρους. Κρυσταλλώνει αργά, σε ένα με δύο χρόνια. Το μέλι καστανιάς έχει

χαρακτηριστικά μελιτώματος, κατατάσσεται όμως στα ανθόμελα, γιατί τα σάκχαρά του είναι αριστερόστροφα. Το μέλι καστανιάς λέγεται ότι ευνοεί την κυκλοφορία του αίματος και είναι ίσως το πιο πλούσιο σε ιχνοστοιχεία, κάλιο, μαγνήσιο, μαγγάνιο και βάριο. Το μέλι καστανιάς, αν και δεν το γνωρίζουμε στην Ελλάδα, είναι περιζήτητο στις αγορές της Κεντρικής Ευρώπης.



Εικόνα 11. Το φυτό *Leptospermum scoparium*, από όπου προέρχεται το μέλι Manuka.

1.1.7 Μέλι Manuka και άλλα αντιβακτηριακά μέλια

Το μέλι Manuka προέρχεται από το φυτό *Leptospermum scoparium*, γηγενές της Ν. Ζηλανδίας και νοτιοανατολικής Αυστραλίας. Είναι θάμνος ή μικρό δέντρο, ιδιαίτερα γνωστό στη φυλή των Maori, οι οποίοι το χρησιμοποιούσαν για αιώνες στην παραδοσιακή ιατρική τους. Το χρησιμοποιούσαν επίσης για τις θεραπευτικές, αντιβιοτικές και αντιβακτηριδιακές του ιδιότητες. Μελέτες έδειξαν ότι το *L. Scoparium* βρισκόταν στην Αυστραλία στην αρχή του Μειοκαίνου (πριν από 23 - 5,3 εκατομμύρια έτη περίπου) και εξαπλώθηκε σχετικά πρόσφατα από την ανατολική Αυστραλία στη Ν. Ζηλανδία. Τώρα βρίσκεται σε όλη τη Ν. Ζηλανδία, αλλά είναι ιδιαίτερα κοινό στις ξηρότερες ανατολικές ακτές του Βορείου και Νοτίου Νησιού και στην Αυστραλία στην Τασμανία, Βικτώρια και στη Νέα Νότια Ουαλία.

Το πανεπιστήμιο του Waikato στο Χάμιλτον της Ν. Ζηλανδίας μελέτησε πρώτο τη σύνθεση του μελιού αυτού και την αντιμικροβιακή του δράση. Η σύγχρονη ιατρική ανέπτυξε μια σχολαστική μέθοδο για να μετράει την αντισηπτική του ισχύ, τον παράγοντα Unique Manuka Factor (UMF). Η μονάδα μέτρησης UMF κατηγοριοποιεί το μέλι με βάση την αντιβακτηριδιακή του δύναμη. Κάθε παρτίδα ελέγχεται συστηματικά από εγκεκριμένο εργαστήριο, και ταξινομείται κατά αύξουσα σειρά αποδοτικότητας σε κλίμακα από το 0 ως το 25.

Όσο υψηλότερο το επίπεδο, τόσο πιο αποδοτική είναι η αντισηπτική δράση του Manuka. Η UMF, η μοναδική αξιόπιστη μονάδα μέτρησης αποδοτικότητας αυτού του μελιού, έχει προκύψει από τη σύγκριση της αντισηπτικής του ιδιότητας με αυτή του διαλύματος

καρβοξυλικού οξέως (πανίσχυρο αντισηπτικό, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στην ιατρική).

Τον Ιανουάριο του 2008 ο καθηγητής Thomas Henle, στο πανεπιστήμιο της Δρέσδης στη Γερμανία, αναγνώρισε την μεθυλγλυοξάλη (MGO) ως τη δραστική ουσία του μελιού Manuka, η οποία ανιχνεύεται σε εξαιρετικά υψηλά επίπεδα (Adams et al., 2008; Mavric, 2008). Η MGO στο Manuka σχηματίζεται από τη μετατροπή της δι-υδροξυ ακετόνης (DHA) που βρίσκεται σε εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις στο νέκταρ των λουλουδιών του Manuka (Adams, 2009). Είναι άγνωστο το πως το DHA σχηματίζεται στο νέκταρ και γιατί είναι παρόν σε τόσο μεγάλες ποσότητες στο Manuka δέντρο. Τώρα πλέον η MGO αναγράφεται στη συσκευασία του μελιού Manuka. Για παράδειγμα, MGO 100 σημαίνει ότι 100mg μεθυλγλυοξάλης περιέχονται σε 1 κιλό μελιού. Το μέλι Manuka έχει εγκριθεί επίσημα για ιατρικούς σκοπούς.

Εκτός από το μέλι Manuka υπάρχουν και άλλα μέλια με αντιβακτηριακή δράση, όπως το Revamil source (RS) μέλι, το μαλαισιανό tualang μέλι και το Ulmo μέλι.

Το RS μέλι παράγεται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες σε θερμοκήπια. Οι παράγοντες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την αντιμικροβιακή δράση αυτού του μελιού είναι η υψηλή συγκέντρωση σε σάκχαρα, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, η μεθυλγλυοξάλη, το χαμηλό pH και το κατιονικό αντιμικροβιακό πεπτίδιο η bee-defensin-1 (Kwakman et al., 2010). Μαζί με το Manuka έχουν ισχυρή αντιβακτηριακή δράση και είναι εγκεκριμένα για επάλειψη σε πληγές.

Το tualang μέλι συλλέγεται από τις μέλισσες του είδους *Apis dorsata*, οι οποίες φτιάχνουν τις κυψέλες τους ψηλά στο δέντρο tualang (*Koompassia excelsa*). Χρησιμοποιείται στην Μαλαισία ως ιατρικό προϊόν (Ainul Hafiza et al., 2005; Ghazali, 2009). Αυτό το μέλι έχει παραπλήσια αντιβακτηριακή δράση με το Manuka ενάντια σε κάποια βακτήρια, αλλά η ποιότητά του και η φυτική του προέλευση (πηγή) δεν έχει ακόμα καθοριστεί και τυποποιηθεί (Hern Tze Tan et al., 2009; Anthimidou and Mossialos, 2013).

Το Ulmo μέλι προέρχεται από το Ulmo δέντρο (*Eucryphia cordifolia*), γηγενές της Χιλής. Η ισχυρή αντιμικροβιακή του δράση οφείλεται κυρίως στο υπεροξειδίο του υδρογόνου (Sherlock et al., 2010). Αποτελεί πιθανή εναλλακτική θεραπεία για πληγές, αλλά χρειάζεται περεταίρω έρευνα (Anthimidou and Mossialos, 2013).

1.1.8 Συστατικά που περιέχονται στο μέλι

- Υδατάνθρακες.
- Νερό (φυσική υγρασία) 16% – 17%. Το νερό αυτό περιέχεται στο νέκταρ που

μαζεύουν οι μέλισσες. Η περιεκτικότητα σε νερό (η υγρασία) στο μέλι επηρεάζει και έχει σημαντικό ρόλο στις φυσικοχημικές ιδιότητες του μελιού.

- Φυσικά σάκχαρα 80% – 82%, τα οποία είναι κατά κύριο λόγο απλά, γι' αυτό και απορροφούνται αμέσως από τον ανθρώπινο οργανισμό και αποτελούν μια άμεση πηγή ενέργειας. Τα βασικά σάκχαρα σε ίση ποσότητα στο μέλι είναι η φυσική φρουκτόζη και η φυσική γλυκόζη, σε μικρότερες ποσότητες είναι η σακχαρόζη και άλλα σάκχαρα.

- Οργανικά οξέα όπως γαλακτικό, μηλικό, κιτρικό, οξικό, οινικό οξύ, οξαλικό οξύ, γλουκονικό οξύ κ.α. Το μέλι περιέχει περίπου 20 οργανικά οξέα, τα οποία διαμορφώνουν κατά ένα μέρος την οσμή και τη γεύση του μελιού, αλλά ταυτόχρονα έχουν καθοριστικό ρόλο στην αντιβακτηριακή δράση του μελιού.

- Διάφορους αντιβιοτικούς και βιολογικούς παράγοντες. Τα ένζυμα και οι βιταμίνες περιέχονται σε ποσοστό περίπου 2,5%.

- Ένζυμα όπως δισμουτάση, υπεροξειδάση, δαστάση, ινβερτάση, οξυδάση, καταλάση, γλυκόζη, φωσφοτάση, τα οποία είναι απαραίτητοι θρεπτικοί καταλύτες.

- Βιταμίνες όπως B2 (ριμποφλαβίνη), B6 (πυριδοξίνη), B3 (παντοθενικό οξύ), Η (βιοτίνη), Β (φολικό οξύ), Κ (αντιαιμοραγίνη), Βιταμίνη C, Καροτίνη (προβιναμίνη Α), α-τοκοφερόλη, ασκορβικό οξύ, β-καροτίνη.

- Πρωτεΐνες. Το μέλι διαθέτει περίπου 20 πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης σε μικρές ποσότητες, με κυριότερη την αλβουμίνη. Περιέχει πεπτόνες, νουκλεοπρωτεΐνες γλοβουλίνες και προλίνη, λυσίνη, αλανίνη.

- Ιχνοστοιχεία όπως σίδηρος, μαγγάνιο, χαλκός, μαγνήσιο και ίχνη ιωδίου, κ.α., απαραίτητα συμπληρωματικά στοιχεία για την υγεία του ανθρώπινου οργανισμού. Τα οργανικά οξέα, οι πρωτεΐνες και τα ιχνοστοιχεία αποτελούν περίπου το 1%.

- Μέταλλα όπως κάλιο, ασβέστιο, χλώριο, νάτριο, που συμμετέχουν στην λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών.

- Λιπίδια όπως για παράδειγμα στερόλες, τριγλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα.

- Πτητικά συστατικά όπως για παράδειγμα αλδεΐδες, κετόνες, αλκοόλες.

- Φυσικές χρωστικές, όπως για παράδειγμα χολίνη και ακετυλοχολίνη.

- Υδροξυ - μεθυλο - φουρφοουράλη.

- Φαινολικά παράγωγα.

- Αρωματικές και χρωστικές ουσίες.

- Γυρεόκκοκοι του μελιού. Το μέλι περιέχει κόκκους γύρης που προέρχονται από τα φυτά που επισκέπτεται η μέλισσα (Τανανάκη, 2002· Κωτίκα, 2012).

1.2 Τι είναι βιοϋμένας

1.2.1 Ορισμός και λειτουργίες του βιοϋμένα

Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι, φυσικά, τα βακτήρια προτιμούν να ζουν σε κοινότητες που σχετίζονται με την επιφάνεια, που ονομάζονται βιοϋμένες. Στους βιοϋμένες, τα βακτήρια είναι ενσωματωμένα σε μια εξωκυτταρική πολυμερική μήτρα ή πλέγμα (matrix), και προστατεύονται από περιβαλλοντικές πιέσεις, την αντιμικροβιακή θεραπεία και το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Οι βιοϋμένες έχουν ενοχοποιηθεί για ποικίλες λοιμώξεις του ανθρώπου, όπως ενδοκαρδίτιδα, οστεομυελίτιδα, χρόνια μέση ωτίτιδα, λοιμώξεις που σχετίζονται με ξένο σώμα, γαστρεντερικά έλκη, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, χρόνιες λοιμώξεις των πνευμόνων σε ασθενείς με κυστική ίνωση, τερηδόνα και περιοδοντίτιδα. Οι αιτιολογικοί παράγοντες των λοιμώξεων που συνδέονται με βιοϋμένα είναι διάφορα θετικά κατά Gram είδη, όπως τα *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, αλλά και Gram-αρνητικά βακτήρια, όπως τα *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* και *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Heilmann and Götz, 2010).

Ένας βιοϋμένας μπορεί να οριστεί ως μια προερχόμενη από μικρόβια άμισχη κοινότητα, που χαρακτηρίζεται από κύτταρα που συνδέονται προς ένα υπόστρωμα, μια διεπαφή, ή το ένα στο άλλο, είναι ενσωματωμένα σε μια μήτρα ή πλέγμα εξωκυτταρικής πολυμερούς ουσίας, και παρουσιάζουν έναν τροποποιημένο φαινότυπο όσον αφορά την αύξηση, τη γονιδιακή έκφραση και την παραγωγή πρωτεϊνών (Donlan et al., 2002). Το πάχος του βιοϋμένα μπορεί να κυμαίνεται από ένα μονό στρώμα κυττάρων ως μια σημαντική κοινότητα, που περιβάλλεται από ένα παχύρρευστο πολυμερικό περιβάλλον. Η δομική ανάλυση έχει δείξει ότι σε ορισμένες περιπτώσεις, μοναδικές δομές στήλης/υποστηλώματος ή σχήματος μανιταριού μπορούν να σχηματίζονται από την αρχιτεκτονική μικρο-αποικιών αυτών των πυκνών βιοϋμένων. Ωστόσο, άλλες δομές σχηματίζονται, ανάλογα με τους περιβαλλοντικούς περιορισμούς. Περίπλοκα δίκτυα διαύλων ρέουν μέσω αυτών των πολύπλοκων δομών και παρέχουν κάποια δυνατότητα πρόσβασης σε βασικά θρεπτικά συστατικά, ακόμη και στις βαθύτερες περιοχές του βιοϋμένα. Αν και ο σχηματισμός βιοϋμένα δεν αποτελεί προϋπόθεση για μια επίμονη λοίμωξη, η εξάλειψη του βιοϋμένα είναι επίπονη, συνήθως απαιτεί χειρουργική επέμβαση και ως εκ τούτου δικαιολογεί περαιτέρω διερεύνηση (Archer et al., 2011).

Αν και ο βιοϋμένας μπορεί να προκύψει από ένα και μόνο κύτταρο, διαφορικές περιβαλλοντικές συνθήκες σε όλη την κοινότητα μπορεί να ενισχύσουν την ανάπτυξη διακριτών υποπληθυσμών. Οι βαθμιδώσεις σε οξυγόνο, θρεπτικά συστατικά και αποδέκτες

ηλεκτρονίων μπορεί να προκαλέσουν ετερογενή έκφραση των γονιδίων κατά μήκος του βιοϋμένα. Σε *in vitro* μοντέλο ενός βιοϋμένα αποικίας σταφυλόκοκκου, εντοπίστηκαν τέσσερις ξεχωριστές μεταβολικές καταστάσεις: κύτταρα που αναπτύσσονται σε αερόβιες συνθήκες, ζύμωση, σε φυτική νάρκη [συμπεριλαμβανομένων κυττάρων σε πολύ αργή ανάπτυξη και επιμενόντων κυττάρων (*persisters*)], ή νεκρά. Τα κύτταρα εκτίθενται στην άνω, πλούσια σε οξυγόνο διεπαφή αέρα και στην κάτω διεπαφή με θρεπτικό υγρό, όπου είναι μεταβολικώς δραστικά. Ωστόσο, η πλειονότητα των κυττάρων ήταν αδρανής και εντοπίζονταν σε ανοξικό περιβάλλον (Brady et al., 2007). Επιπλέον, η ετερογένεια της πρωτεϊνικής έκφρασης του βιοϋμένα αποδείχθηκε με πολλαπλές πρωτεΐνες που συνδέονται με το τοίχωμα του κυττάρου. Η έκφραση φάνηκε να ποικίλει σε συστάδες κυττάρων κατά μήκος του βιοϋμένα, και σε μία περίπτωση, η διαφορική έκφραση οπτικοποιήθηκε από κύτταρο σε κύτταρο (*cell-cell basis*) (Archer et al., 2011).

Εντός της κοινότητας του βιοϋμένα, τα βακτηρίδια επικοινωνούν μεταξύ τους με τη χρήση μορίων χημικού σήματος σε απόκριση προς την πυκνότητα του πληθυσμού, σε μια διαδικασία που ονομάζεται αίσθηση απαρτίας [*quorum sensing* (QS), ανασκόπηση από τους Waters and Bassler, 2005]. Η επικοινωνία μεταξύ κυττάρων μέσω της QS αφορά στην παραγωγή, την απελευθέρωση, την ανίχνευση και αντιμετώπιση μικρών μορίων που μοιάζουν με ορμόνη (*hormone-like molecules*), όπως αυτά που ονομάζονται φερομόνες ή αυτοεπαγωγείς (*autoinducers*, AIs). Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, τα βακτήρια παράγουν AIs, οι οποίοι ενεργοποιούν το σύστημα QS, φτάνοντας σε ένα κατώφλι συγκέντρωσης. Τρεις διαφορετικοί τύποι AIs είναι σήμερα γνωστοί: λακτόνες N-ακυλο-ομοσερίνης που χρησιμοποιούνται κυρίως από Gram-αρνητικά βακτηρίδια και εκκρινόμενα κυκλικά ολιγοπεπτίδια με δομή θειολακτόνης, που προτιμώνται από θετικά κατά Gram βακτήρια. LuxS/AI-2 παράγονται τόσο από Gram-αρνητικά, όσο και από Gram-θετικά βακτηρίδια και πιστεύεται ότι λειτουργούν στην επικοινωνία μεταξύ των ειδών (Waters and Bassler, 2005; Heilmann and Götz, 2010).

Διάφορες φυσιολογικές δραστηριότητες ρυθμίζονται μέσω QS σε Gram-θετικά βακτηρίδια, συμπεριλαμβανομένου του σχηματισμού βιοϋμένα σε σταφυλόκοκκους, στρεπτόκοκκους και εντερόκοκκους, της έκφρασης των παραγόντων της λοιμογόνου δύναμης σε σταφυλόκοκκους, της ανάπτυξης των κατάλληλων ικανοτήτων στους στρεπτόκοκκους, της σπορίωσης στον *Bacillus*, και της αντιβιοτικής βιοσύνθεσης στον *Lactococcus lactis* (Waters and Bassler, 2005; Heilmann and Götz, 2010).

Με την υιοθέτηση αυτού του τρόπου ζωής με σταθερή πρόσφυση, οι ενσωματωμένοι σε βιοϋμένες μικροοργανισμοί επωφελούνται από μια σειρά από πλεονεκτήματα, σε σχέση με

τους πλαγκτονικούς ομολόγους τους. Η εξωκυτταρική μήτρα ή πλέγμα, είναι ικανή να απομονώνει και να συμπυκνώνει τα θρεπτικά συστατικά από το περιβάλλον, όπως άνθρακας, άζωτο και φωσφορικά (άλατα). Ένα πρόσθετο όφελος για την τροπικότητα της αύξησης του βιοϋμένα, είναι η ικανότητα να αποφεύγει πολλαπλούς μηχανισμούς εκκαθάρισης που παράγονται από τον ξενιστή και συνθετικές πηγές. Παραδείγματα αναποτελεσματικών στρατηγικών εκκαθάρισης περιλαμβάνουν αντιμικροβιακά και αντιρρυπαντικά μέσα, διατμητική τάση, την εξάλειψη φαγοκυτταρική υποδοχής και άμυνες ριζών και πρωτεάσης του ξενιστή. Η αντοχή σε αντιμικροβιακούς παράγοντες διαμεσολαβείται μέσω ενός αδρανούς φαινότυπου που προκαλείται από την προσαρμογή σε ανοξικό περιβάλλον και τη στέρηση θρεπτικών ουσιών, και έχει ως αποτέλεσμα χαμηλά μεταβολικά επίπεδα και ριζικά μειορρυθμισμένα ποσοστά κυτταρικής διαίρεσης. Αυτό το πιεστικό περιβάλλον παράγει πολλά βραδέως αναπτυσσόμενα κύτταρα, που είναι ανθεκτικά σε υψηλά επίπεδα αντιβιοτικών, αλλά και ένα μέρος επιμενόντων κυττάρων (persister cells) (όχι περισσότερο από το ~1 % του συνολικού πληθυσμού). Αυτά τα κύτταρα βρίσκονται σε κοινότητες βιοϋμένα, αλλά υπάρχουν επίσης σε πλαγκτονικές καλλιέργειες (Spoering et al. 2001).

Επιπλέον, ανθεκτικά κύτταρα επιδεικνύουν ανοχή σε πολλαπλά φάρμακα, που είναι εγγενώς διαφορετική από την αντίσταση, η οποία είναι να προληφθεί το χτύπημα του μικροβιακού στόχου από το αντιβιοτικό. Αντί γι' αυτό, ανθεκτική ανοχή επιτυγχάνεται θέτοντας «εκτός λειτουργίας» τους μικροβιακούς στόχους ή την κυτταρική ανάγκη για τους στόχους αυτούς, με τη διατήρηση μιας κατάστασης μεταβολικής ηρεμίας, προστατεύοντας έτσι το κύτταρο από ακόμη πιο βακτηριοκτόνα αντιβιοτικά. Αν και ο μηχανισμός για την επίτευξη αυτής της μεταβολικής κατάστασης στο *S. aureus* δεν είναι πλήρως κατανοητός, στο *E. coli* έχει διατυπωθεί ότι επιτυγχάνεται μέσω ενός ορισμένου ποσοστού των κυττάρων στο συνολικό μικροβιακό πληθυσμό, που έχει δραστικά μειορρυθμιστικές βιοσυνθετικές οδούς και παραγωγή τοξίνης/αντιτοξίνης, παράγοντας έτσι ένα φαινότυπο ανθεκτικό σε αυτό τον υποπληθυσμό. Προστατεύοντας αυτά τα κύτταρα εντός του βιοϋμένα, οι τελεστές του ανοσοποιητικού συστήματος παρεμποδίζονται να εκκαθαρίσουν αυτούς τους πληθυσμούς (Archer et al., 2011).

Έτσι, από τη στιγμή που σταματούν τα σχήματα αντιβιοτικών, οι επιμένοντες παράγοντες είναι σε θέση να μετατοπιστούν αυθόρμητα από την κατάσταση ηρεμίας τους και να παραγάγουν μια επανενεργοποίηση της λοίμωξης. Ενώ οι χαμηλοί ρυθμοί του μεταβολισμού μπορούν να εξηγήσουν ένα μεγάλο μέρος των ιδιοτήτων αντιμικροβιακής αντοχής του βιοϋμένα, και άλλοι παράγοντες μπορούν να παίξουν ένα ρόλο. Ένα τέτοιο χαρακτηριστικό μπορεί να είναι η ικανότητα των βιοϋμένων να δρουν ως ένα φράγμα

διάχυσης, για να επιβραδύνουν τη διείσδυση ορισμένων αντιμικροβιακών παραγόντων. Για παράδειγμα, δραστικά παράγωγα χλωρίου (όπως υποχλωριώδη, χλωραμίνες ή διοξειδίο του χλωρίου) σε έναν αριθμό αντιρρυπαντικών παραγόντων μπορεί να απενεργοποιηθούν στα επιφανειακά στρώματα του βιοϋμένα πριν να είναι σε θέση να διασπαρούν προς τα χαμηλότερα επίπεδα. Επιπλέον, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι διάφορα αντιβιοτικά (οξακιλλίνη, κεφοταξίμη και βανκομυκίνη) είχαν μειωμένη διείσδυση κατά μήκος των βιοϋμένων των *S. aureus* και *S. Epidermidis* (Singh et al., 2010; Archer et al., 2011).

Το τελικό όφελος από την ανάπτυξη βιοϋμένα, είναι η δυνατότητα για διασπορά ή κυτταρική αποκόλληση. Μικρο-αποικίες μπορεί να αποσπαστούν υπό τη διεύθυνση μηχανικών δυνάμεων διάτμησης σε ρευστό, ή μέσω μιας γενετικά προγραμματισμένης απόκρισης που μεσολαβεί την διαδικασία διασποράς. Κατά παρόμοιο τρόπο με ένα μεταστατικό καρκινικό κύτταρο, ανεξάρτητες μικρο-αποικίες μεταναστεύουν από την αρχική κοινότητα του βιοϋμένα σε μη μολυσμένες περιοχές του ξενιστή υποδοχής, προσαρτώνται και προωθούν το σχηματισμό νέου βιοϋμένα (Archer et al., 2011).

Ο βιοϋμένας είναι ο αποικιακός τρόπος ζωής των μικροοργανισμών. Πιο σωστά, έχει οριστεί ως συμπλέγματα μικροβιακών συναθροίσεων, αγκυροβολημένα σε αβιοτικές ή βιοτικές επιφάνειες. Αυτή η μικροβιακή συνάθροιση μπορεί να φιλοξενεί απλούς ή πολλαπλούς μικροβιακούς πληθυσμούς ή μικροαποικίες. Τα κύτταρα είναι ενσωματωμένα σε εξωκυτταρική μήτρα, όπου αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με το περιβάλλον. Αυτή η μικρογραφία οικοσυστήματος παρέχει ασφάλεια για τα μέλη της κοινότητας, όπου παραμένουν ανέγγιχτα από τους μηχανισμούς καταπολέμησης των ανοσολογικών αποκρίσεων του ξενιστή, τη φαγοκυττάρωση και τη θεραπεία με αντιβιοτικά. Οι Watnick και Kolter (2000) δικαίως το αποκάλεσαν ως πόλη των μικροβίων. Ο σχηματισμός βιοϋμένα έχει παρατηρηθεί ότι συμβαίνει από τα περισσότερα από τα βακτήρια που βρίσκονται σε φυσικά, κλινικά και βιομηχανικά περιβάλλοντα (Sawhney and Berry, 2009).

1.2.2 Γιατί συγκροτούνται οι βιοϋμένες

Ο σχηματισμός βιοϋμένα έχει επίσης τεκμηριωθεί ως στρατηγική επιβίωσης των παθογόνων παραγόντων. Ορισμένοι μικροοργανισμοί στον βιοϋμένα μπορούν ακόμη και να διαμορφώσουν το παθογόνο δυναμικό των βακτηρίων, όπως είναι προφανές από τα βακτήρια που προκαλούν τερηδόνα, σε βιοϋμένα πλάκας (Sawhney and Berry, 2009).

Οι βιοϋμένες έχει αναφερθεί ότι είναι λιγότερο επιρρεπείς σε αντιμικροβιακούς παράγοντες και έχουν μειωμένη ευαισθησία σε αναστολείς, αυξάνοντας έτσι την επιβίωσή τους (Jabra-Rizk et al., 2006). Τα ευρήματα έδειξαν καθυστερημένη διείσδυση της

σιπροφλοξασίνης σε βιοϋμένα του *Pseudomonas aeruginosa*. Βιοϋμένας του *E. coli* εμφάνισε μειωμένη ευαισθησία στην κετριμίδη. Παρόμοιες αναφορές είναι διαθέσιμες για την έκθεση του *Staphylococcus aureus* σε τομπραμυκίνη. Η αντίσταση που παρουσιάζουν αυτοί οι βιοϋμένες, σε γενικές γραμμές έχει αποδοθεί σε παράγοντες όπως η κακή διείσδυση των αντιμικροβιακών, ο περιορισμός των θρεπτικών ουσιών, η συσσώρευση τοξικών μεταβολιτών και η μειωμένη τάση οξυγόνου (Sawhney and Berry, 2009).

Οι βιοϋμένες ενεργούν επίσης ως ασφαλής θέση για την επιβίωση μικροοργανισμών, τα οποία αποτελούν τροφή για τα πρωτόζωα. Οι μελέτες σχετικά με το *V. cholerae* έδειξαν ότι οι βιοϋμένες είναι οι προστατευτικοί παράγοντες που επιτρέπουν στον οργανισμό να επιβιώνει από τη βόσκηση (grazing) των πρωτοζώων (Sawhney and Berry, 2009).

1.2.3 Πώς σχηματίζονται οι βιοϋμένες;

Οι ερευνητές έχουν την άποψη ότι ο σχηματισμός βιοϋμένων διαμεσολαβείται από μια σειρά μηχανικών, βιοχημικών και γενετικών εργαλείων (Sawhney and Berry, 2009).

Εκτός από αυτό, ορισμένες φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις όπως η υδροφοβικότητα κυτταρικής επιφάνειας (μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μακράς εμβέλειας, που ορίζονται ως η έλξη μεταξύ των απολικών ή ελαφρώς πολικών κυττάρων, ή άλλων μορίων που εμβαπτίζονται σε ένα υδατικό διάλυμα), το φορτίο, η τραχύτητα και η χημική σύσταση του υλικού, έχουν επίσης μελετηθεί και έχει βρεθεί ότι μεσολαβούν τη βακτηριακή προσκόλληση στην επιφάνεια κατά τον σχηματισμό βιοϋμένα (Sawhney and Berry, 2009).

Οι μελέτες σχετικά με το *Staphylococcus epidermidis* ανέφεραν ότι η προσκόλλησή του συμβαίνει σε υψηλότερο βαθμό σε υπόστρωμα σιλικόνης, σε σύγκριση με το ακρυλικό. Αυτή η συμπεριφορά έχει αποδοθεί στην υψηλότερη υδροφοβικότητα της επιφάνειας και την τραχύτητα της σιλικόνης, σε σύγκριση με το ακρυλικό (Sawhney and Berry, 2009).

Η τραχύτητα των πολυμερικών επιφανειών έχει επίσης ενοχοποιηθεί σε κάποιο βαθμό για την προώθηση της προσκόλλησης των βακτηριακών κυττάρων, λόγω της αυξημένης επιφάνειας και την προστασία από διατμητικές δυνάμεις κατά τη διάρκεια του αποικισμού. Ο σχηματισμός του βιοϋμένα επί χλωριούχου πολυβινυλίου (PVC), πολυαιθυλενίου (PE) και επιφανειών από ανοξείδωτο χάλυβα, έχει επίσης μελετηθεί. Παρατηρήθηκε ότι σε γενικές γραμμές, η συσσώρευση βιοϋμένα σε επιφάνειες από διαφορετικά υλικά ήταν αρκετά παρόμοια. Ωστόσο, ο όγκος των κυττάρων καταγράφηκε ότι είναι ελαφρώς υψηλότερος στην PE επιφάνεια, από ό,τι στην PVC επιφάνεια.

Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες σχετικά με τα *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus epidermidis*, πρότειναν ότι η προσκόλληση ήταν εξαρτώμενη από την

ελεύθερη ενέργεια και την τραχύτητα της επιφάνειας πυρολυτικού άνθρακα. Έτσι, η βελτίωση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων πυρολυτικού άνθρακα έχει προταθεί ως ένα χαρακτηριστικό που οδηγεί σε μείωση των λοιμώξεων που ξεκινούν από βαλβιδικά προθέματα. Ωστόσο, οι βιοϋμένες σχηματίζονται κατά προτίμηση σε υψηλές θέσεις διάτμησης, οι οποίες μπορεί να είναι τόσο μικρές, όσο οι καρδιακές βαλβίδες (Sawhney and Berry, 2009).

1.2.4 Σχηματισμός βιοϋμένα στον χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο (*Staphylococcus aureus*)

1.2.4.1 Σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις και βιοϋμένας

Μεταξύ των θετικών κατά Gram βακτηρίων, ο σχηματισμός βιοϋμένα έχει μελετηθεί πιο έντονα στους σταφυλόκοκκους. Σε αντίθεση με πολλούς βιοϋμένες που απαντώνται σε φυσικά περιβάλλοντα, όπου ένας βιοϋμένας συνήθως αποτελείται από μια μικροβιακή κοινότητα πολλών ειδών, οι λοιμώξεις που οφείλονται σε σταφυλόκοκκους στην πλειοψηφία τους, αλλά όχι πάντοτε, είναι μονοειδικές (von Eiff et al., 1999). Τα πιο σημαντικά είδη σταφυλόκοκκου που εμπλέκονται σε λοιμώξεις που σχετίζονται με βιοϋμένα, είναι τα *Staphylococcus epidermidis* (κυρίως προκαλώντας λοιμώξεις που σχετίζονται με ξένο σώμα) και *Staphylococcus aureus* (συνήθως προκαλεί λοιμώξεις που σχετίζονται με τον αποικισμό των ιστών του ξενιστή) (Heilmann and Götz, 2010).

Η λειτουργία της ανάπτυξης βιοϋμένα του *Staphylococcus aureus* ρυθμίζεται αυστηρά από πολύπλοκους γενετικούς παράγοντες. Οι ανοσολογικές απαντήσεις του ξενιστή έναντι επίμονων λοιμώξεων από βιοϋμένα, είναι σε μεγάλο βαθμό αναποτελεσματικές και οδηγούν στην ανάπτυξη χρόνιων ασθενειών. Ωστόσο, οι έρευνες μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη αποτελεσματικών θεραπειών κατά του βιοϋμένα του *S. Aureus* (Archer et al., 2011).

Οι σταφυλόκοκκοι είναι πανταχού (ολικοί) συμβιωτικοί οργανισμοί του δέρματος και των βλεννογόνων των ανθρώπων και των ζώων. Στους ανθρώπους, το *S. aureus* και το αρνητικό στην κοαγκουλάση *S. epidermidis* είναι από τις κύριες αιτίες των νοσοκομειακών λοιμώξεων (Karlowsky et al., 2002). Λοιμώξεις που οφείλονται στο *S. epidermidis* τυπικά είναι περισσότερο υποξείες ή ακόμη και χρόνιες και απαιτούν μια προδιάθεση ή ανοσοκατασταλμένους ξενιστές, όπως ασθενείς που εξαρτώνται από ιατρικές συσκευές (π.χ., προσθετικές βαλβίδες της καρδιάς και των αρθρώσεων, τεχνητοί βηματοδότες και ενδοαγγειακοί καθετήρες). Σε αντίθεση, το *S. aureus* προκαλεί περισσότερες οξείες λοιμώξεις που συνδέονται με τον αποικισμό του ιστού του ξενιστή, όπως ενδοκαρδίτιδα και

οστεομυελίτιδα, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε σήψη. Περιστασιακά, το *S. epidermidis* μπορεί να προκαλέσει ενδοκαρδίτιδα φυσικής βαλβίδας (Heilmann and Götz, 2010).

Η παρουσία μεγάλων προσκολλημένων βιοϋμένων επί εκφυτευμένων (explanted) ενδοαγγειακών καθετήρων, έχει αποδειχθεί με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης. Οι μικροοργανισμοί μέσα σε έναν βιοϋμένα προστατεύονται από την αντιμικροβιακή χημειοθεραπεία, καθώς και έναντι του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή (Heilmann and Götz, 2010).

Για να σχηματίσουν ένα βιοϋμένα, οι σταφυλόκοκκοι πρώτα προσκολλώνται, είτε στον ιστό του ξενιστή, είτε στην επιφάνεια μιας ιατρικής συσκευής, και στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται και συσσωρεύονται σε πολυστρωματικές συστάδες κυττάρων, τα οποία είναι ενσωματωμένα σε ένα άμορφο εξωκυττάριο υλικό, το οποίο αποτελείται κυρίως από N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη, τειχοϊκά οξέα κυτταρικού τοιχώματος, DNA, και προϊόντα του ξενιστή (Baldassarri et al., 1996; Mack et al., 1996). Ένας ώριμος βιοϋμένας περιέχει διαύλους γεμάτους με υγρό, που εξασφαλίζουν την παράδοση θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου για τα βακτηριακά κύτταρα που βρίσκονται βαθύτερα στο βιοϋμένα. Από έναν ώριμο βιοϋμένα, μπορεί να αποσπαστούν μεμονωμένα κύτταρα ή συσσωματώματα κυττάρων. Μετά την απόσπαση από το βιοϋμένα, τα βακτήρια μπορεί να διαδοθούν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, το οποίο πιστεύεται ότι οδηγεί σε μεταστατική μόλυνση ή/και την ανάπτυξη σήψης (Heilmann and Götz, 2010).

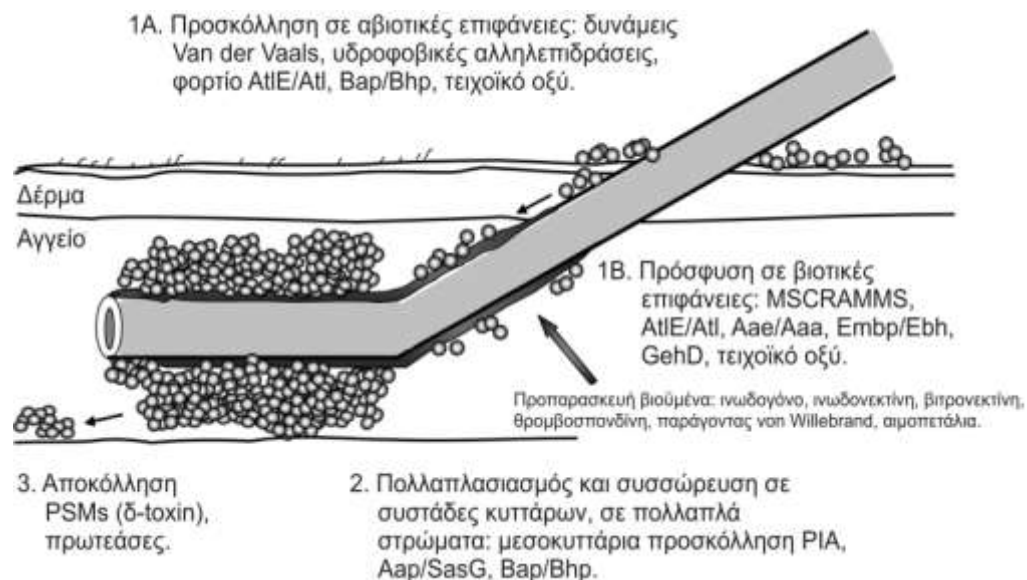
1.2.4.2 Προσάρτηση σε αβιοτικές επιφάνειες

Η μικροβιακή προσκόλληση σε βιοϋλικά εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση του πολυμερούς υλικού και τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας των κυττάρων των βακτηρίων. Οι αρχικές αλληλεπιδράσεις πιστεύεται ότι συμβαίνουν μέσω μη ειδικών φυσικοχημικών δυνάμεων, όπως είναι το φορτίο, οι δυνάμεις van der Waals και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Ο αποικισμός των αβιοτικών επιφανειών από το *S. aureus* εξαρτάται από το φορτίο του τοιχοϊκού οξέος. Τα τειχοϊκά οξέα του *S. aureus* είναι υψηλά φορτισμένα πολυμερή του κυτταρικού τοιχώματος, που αποτελείται από φωσφορικά και ριβιτόλη (λιπαρά τειχοϊκών τοιχώματος) που εναλλάσσονται, ή ομάδες γλυκερόλης (λιποτειχοϊκά οξέα) (Grosset et al., 2001; Heilmann and Götz, 2010).

Η εκκίνηση της προσκόλλησης έχει επίσης αποδοθεί σε βακτηριακές πρωτεΐνες επιφανείας. Η αυτολυσίνη AtlE του *S. epidermidis* O-47 ταυτοποιήθηκε ως σχετιζόμενο με επιφάνεια συστατικό που μεσολαβεί την πρωτογενή προσκόλληση βακτηριακών κυττάρων σε μια επιφάνεια πολυστυρενίου (Heilmann et al., 1997). Το 148-kDa AtlE και η ομόλογη

αυτολυσίνη Atl του *S. Aureus*, διασπώνται πρωτεολυτικά σε δύο βακτηριολυτικά δραστικούς τομείς, μια N-τερματική αμιδάση και μια C-τερματική γλυκοζαμινιδάση (Heilmann et al., 1997; Biswas et al., 2006). Στο κεντρικό τμήμα των πρωτεϊνών, υπάρχουν τρεις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που εμπλέκονται ενδεχομένως στη λειτουργία προσκόλλησης (Heilmann and Götz, 2010).

Άλλη μια πρωτεΐνη του *S. aureus*, η 239-kDa πρωτεΐνη που σχετίζεται με βιοϋμένα, η Bar, εμπλέκεται σε προσκόλληση σε επιφάνεια πολυστυρενίου και διακυτταρική πρόσφυση, που οδηγεί σε σχηματισμό βιοϋμένα (Cucarella et al., 2001). Τα διαρθρωτικά χαρακτηριστικά της Bar αντιστοιχούν σε εκείνα άλλων τυπικών Gram-θετικών επιφανειακών πρωτεϊνών, που ονομάζονται MSCRAMMs [μικροβιακά συστατικά επιφάνειας που αναγνωρίζουν μόρια προσκόλλησης του πλέγματος (adhesive matrix molecules)]. Ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια Bar-ομόλογη πρωτεΐνη, την 258-kDa Bhp, είναι παρούσα στο κλινικό στέλεχος *S. epidermidis* RP62A του ανθρώπου (Bowden et al., 2002; Heilmann and Götz, 2010).



PSMs: Phenol Soluble Modulins, ρυθμιστικά μόρια διαλυτά στη φαινόλη. MSCRAMMS: Microbial Surface Component Recognising Adhesive Matrix Molecules, στοιχεία της επιφάνειας μικροβίου, που έχουν την ικανότητα να συνδέονται με μόρια προσκόλλησης του εξωκυττάριου στρώματος (ή ουσίας). AtlE/Atl: autolysin of *Staphylococcus aureus*, αυτολυσίνη του *Staphylococcus aureus*. Aae: amino acid enantiomers, εναντιομερή αμινοξέων. Aaa: Alpha-antiplasmin, Alpha-αντιπλασμίνη. EMBP: eosinophil major basic protein, μείζονα βασική πρωτεΐνη ηωσινόφιλων. Ebh: cell-wall-associated adhesion protein of *staphylococci*, πρωτεΐνη προσκόλλησης των σταφυλόκοκκων, η οποία σχετίζεται με το κυτταρικό τοίχωμα. GehD: collagen-binding protein, πρωτεΐνη δέσμευσης κολλαγόνου. SasG: *S. aureus* surface protein G, G πρωτεΐνη επιφάνειας του *S. aureus*. Bar: Biofilm Matrix Protein, πρωτεΐνη εξωκυττάριου στρώματος (ή ουσίας), του βιοϋμένα. Bhp: bacteriohopanepolyols, οπανιοπολυόλες βακτηρίου.

Εικόνα 12. Μοντέλο των διαφόρων φάσεων σχηματισμού σταφυλοκοκκικού βιοϋμένα και των παραγόντων που εμπλέκονται. Οι βιοϋμένες αναπτύσσονται κατά την αρχική προσκόλληση σε επιφάνειες, οι οποίες μπορεί να είναι αβιοτικές (επιφάνειες πολυμερούς), ή βιοτικές (επιφάνεια πολυμερούς επικαλυμμένη με πρωτεΐνες εξωκυττάριας μήτρας (ή πλέγματος) και πρωτεΐνες του πλάσματος (ή ιστού του ξενιστή), και με επακόλουθο πολλαπλασιασμό και συσσώρευση σε πολυστρωματικές συστάδες κυττάρων, η οποία απαιτεί ενδοκυτταρική προσκόλληση. Από έναν ώριμο βιοϋμένα, κύτταρα ή κυτταρικά συσσωματώματα μπορούν να αποκολληθούν και να διασπαρούν (Heilmann and Götz, 2010).

1.2.4.3 Σχηματισμός βιοϋμένα *Pseudomonas aeruginosa*

Τα βακτήρια σε βιοϋμένα διαφοροποιούνται ιδιαίτερα από τα βακτήρια που ζουν ελεύθερα και συχνά παρουσιάζουν μια αναπτυξιακή αλληλουχία, σχηματίζοντας σύνθετες, εγκιβωτισμένες σε μήτρα, πολυκύτταρες δομές (μικροαποικίες) οι οποίες περιβάλλονται από ένα δίκτυο διαύλων νερού (Webb et al., 2003).

Ο διαφοροποιημένος φαινότυπος μικροαποικιών έχει βρεθεί στους περισσότερους βακτηριακούς βιοϋμένες που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων των *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Vibrio cholerae*. Στην κυστική ίνωση των πνευμόνων, το *P. aeruginosa* σχηματίζει δομές μικροαποικιών που εξέχουν και συσχετίζεται με ανθεκτικές στα αντιβιοτικά, συχνά θανατηφόρες λοιμώξεις. Ωστόσο, πολλά ακόμη μένουν να γίνουν γνωστά για τους οικολογικούς και φυσιολογικούς ρόλους των μικροαποικιών στους βιοϋμένες. Η σηματοδότηση από κύτταρο σε κύτταρο (cell-cell signaling), εμπλέκεται στην ανάπτυξη μικροαποικιών σε τουλάχιστον τρεις οργανισμούς, τους *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, και *Aeromonas hydrophila*. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι διάλυοι νερού γύρω από τις μικροαποικίες *P. aeruginosa* συντηρούνται ενεργά από την ελεγχόμενη από αντίληψη απαρτίας παραγωγή (quorum sensing, αντίληψη απαρτίας, ή αίσθηση μεγέθους πληθυσμού) επιφανειοδραστικών ουσιών ραμνολιπιδίου. Επιπλέον, έχει καταδειχθεί πρόσφατα η διασπορά κυττάρων που ζουν ελεύθερα (free-living cells), από κενά μέσα στις μικροαποικίες του *P. Aeruginosa* (Sauer et al., 2002). Στο σύνολό τους, τα δεδομένα αυτά προτείνουν ότι ο σχηματισμός μικροαποικιών είναι μια συντονισμένη, προσαρμοστική απάντηση που διευκολύνει τη συνεχή ανάπτυξη και διασπορά των βιοϋμένων. Ωστόσο, οι βασικές διαδικασίες που ρυθμίζουν την πολυκυτταρική διαφοροποίηση και διασπορά μέσα σε μικροαποικίες, είναι ελάχιστα κατανοητές (Webb et al., 2003).

Υποτίθεται ότι πολυκύτταρες αλληλεπιδράσεις μεταξύ προκαρυωτών έχουν εξελιχθεί σε βιοϋμένες που σχετίζονται με επιφάνεια. Έτσι, ίσως είναι σκόπιμο να εξεταστούν αυτοί οι βιοϋμένες βακτηριακών πληθυσμών για την προέλευση των βασικών πολυκύτταρων χαρακτηριστικών που προκύπτουν σε άλλους, πιο πολύπλοκους οργανισμούς. Σε πολυκύτταρους οργανισμούς, ο θάνατος των κυττάρων είναι ένα φυσιολογικό συστατικό της ανάπτυξης. Πράγματι, ο προγραμματισμένος θάνατος των κυττάρων γενικά πιστεύεται ότι είναι μια προσαρμογή που εξελίχθηκε για να ανταποκριθεί στις εξειδικευμένες ανάγκες της πολυκύτταρης ζωής. Αυξανόμενες ενδείξεις υποδεικνύουν ότι ο προγραμματισμένος θάνατος των κυττάρων προκύπτει και αυτός κατά τη βακτηριακή ανάπτυξη. Για παράδειγμα, η ανάπτυξη πολυκύτταρων σποροφόρων οργανισμών στο *Myxococcus xanthus* απαιτεί αυτόλυση ενός υποπληθυσμού κυττάρων του *M. xanthus*. Η αυτόλυση, η οποία φαίνεται να είναι ανεπιθύμητη για έναν μονοκύτταρο οργανισμό, μπορεί να είναι πλεονεκτική για ένα βακτηριακό πληθυσμό σε πολυκυτταρικό επίπεδο. Η αυτόλυση δεν έχει ακόμη εξεταστεί στο πλαίσιο της ανάπτυξης των πολυκύτταρων βακτηριακών βιοϋμένων (Webb et al., 2003).

Αυτόλυση έχει προηγουμένως παρατηρηθεί σε προϊόντα απομόνωσης του *P. aeruginosa*. Στις αρχικές περιγραφές του φαινομένου αυτού οι εργαζόμενοι ανέφεραν ζώνες λύσης βακτηριοφάγου παρόμοιες με πλάκα (plaque-like zones), σε καλλιέργειες *P. aeruginosa* σε άγαρ. Πιο πρόσφατα, μεταλλάγματα *P. aeruginosa* που υπερπαραγωγή το μόριο σήματος αντιβιοτικού και αίσθησης απαρτίας 2-επτυλ-3-υδροξυ-4-κινολόνη, παρουσίασαν έντονη λύση σε πλάκες άγαρ. Ωστόσο, ο μοριακός μηχανισμός και ο φυσιολογικός ρόλος της αυτόλυσης στην *P. aeruginosa* δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί (Webb et al., 2003).

Σε αυτή τη μελέτη, διερευνήθηκε η υπόθεση ότι ο κυτταρικός θάνατος στην *P. aeruginosa* ίσως λειτουργεί στην ανάπτυξη πολυκύτταρου βιοϋμένα. Παρατηρήθηκε ότι η θανάτωση και λύση συμβαίνουν σε εντοπισμένες περιοχές σε βιοϋμένα άγριου τύπου *P. Aeruginosa*, μέσα σε μικροαποικίες, με ένα μηχανισμό που περιλαμβάνει ένα γονιδιωματικό προφάγο του *P. aeruginosa*. Προτείνεται ότι ο κυτταρικός θάνατος που μεσολαβείται από προφάγο, ωφελεί έναν υποπληθυσμό κυττάρων που επιβιώνουν και έχει σημαντικό ρόλο στην μετέπειτα διαφοροποίηση και διασπορά του βιοϋμένα (Webb et al., 2003).

1.3 Παθογένεια *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa*



Εικόνα 13. *Staphylococcus aureus*.

1.3.1 Παθογένεια χρυσίζοντος σταφυλόκοκκου (*Staphylococcus aureus*)

Ο *S. aureus* ανήκει στο γένος των βακτηρίων που είναι θετικοί κατά Gram κόκκοι. Υποδιαιρείται σε διάφορα επίπεδα σχηματίζοντας ακανόνιστες μάζες που μοιάζουν με τσαμπί σταφυλιού. Εκεί οφείλει και την ονομασία του. Ο *S. aureus* είναι το πιο κοινό είδος σταφυλόκοκκου το οποίο προκαλεί τις πιο συχνές μολύνσεις που οφείλονται σε σταφυλόκοκκους. Ένας από τους λόγους για αυτό είναι μια καροτινοειδής χρωστική ουσία, η σταφυλοξανθίνη (staphyloxanthin), η οποία είναι υπεύθυνη για το χαρακτηριστικό χρυσό χρώμα των αποικιών του *S. Aureus*.

Αναπτύσσεται στο δέρμα, στην ανώτερη αναπνευστική οδό, ιδίως στη μύτη και στο λαιμό, στη φυσιολογική χλωρίδα του ρινοφάρυγγα των υγιών ενηλίκων, οι οποίοι μπορεί να είναι φορείς του παθογόνου, χωρίς ωστόσο να νοσούν. Μπορεί επίσης να επιβιώσει σε οικόσιτα ζώα όπως τα σκυλιά, οι γάτες, τα άλογα.

Ο *S. aureus* είναι ένα από τα σημαντικότερα νοσοκομειακά παθογόνα. Πρόκειται για το συνηθέστερο αιτιολογικό παράγοντα της πνευμονίας και το τρίτο κατά σειρά σημαντικότερο αίτιο λοιμώξεων του αίματος. Πολλά στελέχη του είναι ασυνήθιστα επιθετικά και ταυτοχρόνως ανθεκτικά στα κοινά αντιβιοτικά, γεγονός που καθιστά την αντιμετώπισή τους ιδιαίτερα δύσκολη (Anthimidou and Mossialos, 2013).

Ο *S. aureus* είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο που μπορεί να προκαλέσει μια ποικιλία από αυτοπεριοριζόμενες, έως απειλητικές για τη ζωή ασθένειες στον άνθρωπο. Τα βακτήρια είναι η κύρια αιτία τροφικής δηλητηρίασης, που προκύπτει από την κατανάλωση τροφίμων που έχουν μολυνθεί με εντεροτοξίνες. Η σταφυλοκοκκική τροφική δηλητηρίαση περιλαμβάνει ταχεία έναρξη, ναυτία, έμετο, κοιλιακό άλγος, κράμπες και διάρροια. Τα συμπτώματα συνήθως υποχωρούν μετά από 24 ώρες (Le Loir et al., 2003). Δήγματα ζώων μπορεί να

οδηγήσουν σε τοπικές λοιμώξεις, κυτταρίτιδα, ερύθημα, ευαισθησία, ήπιο πυρετό, λεμφαδενοπάθεια και λεμφαγγειίτιδα (σπάνια). Το σύνδρομο της ιχθύωσης ή αποφολιδωτικό του δέρματος (scalded skin syndrome) προκαλείται από απολεπιστικές τοξίνες, που εκκρίνονται στην επιδερμίδα και επηρεάζει κυρίως νεογνά και μικρά παιδιά. Άλλες παθολογικές καταστάσεις του δέρματος που προκαλούνται από σταφυλοκοκκικές απολεπιστικές τοξίνες περιλαμβάνουν φυσαλίδες (φλύκταινες) (blisters), απώλεια δέρματος, ακμή, δοθιήνες, μολυσματικά κηρία, θυλακίτιδα, αποστήματα, τον πλημμελή έλεγχο της θερμοκρασίας, απώλεια υγρών, καθώς και δευτερογενή μόλυνση (secondary infection) (Le Loir et al., 2003; Fridkin et al., 2005; Public Health Agency of Canada, 2012).

Προκαλεί πυρετογόνες μολύνσεις (εξανθήματα κλπ.), λοιμώξεις του δέρματος και των πλεγμών, λοιμώξεις του αναπνευστικού, σύνδρομο τοξικής καταπληξίας (TTS), τοξική επιδερμική νεκρόλυση, δοθιήνες, φλύκταινες, οστεομυελίτιδα, μηνιγγίτιδα, αρθρίτιδα. Επίσης ο *S.aureus* είναι το συνηθέστερο παθογόνο σε έλκη διαβητικών. Η δυσλειτουργία των αμυντικών μηχανισμών γύρω από τους νεκρωμένους ιστούς ή μέσα στα οστά επιτρέπει στον *S.aureus* να προκαλεί οξείες λοιμώξεις. Τοπική χρήση επιθεμάτων μελιού έχουν ευεργετική επίδραση στις πληγές αυτές, καθώς και σε τομές εγχείρησης και εγκαύματα που έχουν προσβληθεί από το βακτήριο. Ο *S.aureus* προκαλεί και τροφικές δηλητηριάσεις, γιατί καθώς αναπτύσσεται παράγει διάφορες θερμοσταθερές πρωτεϊνικές εντεροτοξίνες, οι οποίες απελευθερώνονται στη μάζα της τροφής. Αν αυτή η μολυσμένη με εντεροτοξίνες τροφή καταναλωθεί, τότε εντός 1 έως 6 ωρών εμφανίζεται γαστρεντερίτιδα συνοδευόμενη από ναυτία και εμετό. Εκτιμάται ότι κάθε χρόνο σημειώνονται, στις ΗΠΑ, 185.000 κρούσματα τροφικής δηλητηρίασης σταφυλοκοκκικής αιτιολογίας. Οι τροφές που συνήθως συνδέονται με δηλητηριάσεις σταφυλοκοκκικής προέλευσης είναι τα προϊόντα που περιέχουν κρέμα, τα διάφορα κρέατα (συμπεριλαμβανομένου του κρέατος πουλερικών), τα αυγά, οι πουτίγκες και οι κρεμώδεις σάλτσες. Θάνατος από σταφυλοκοκκική τροφική δηλητηρίαση είναι πολύ σπάνιος, αν και τέτοιες περιπτώσεις έχουν συμβεί μεταξύ των ηλικιωμένων, των βρεφών και σοβαρά εξασθενημένων ατόμων.

Ο *S. aureus* μπορεί επίσης να προκαλέσει νεκρωτική περιτονίτιδα σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα, αν και αυτό είναι πολύ σπάνιο. Η νεκρωτική περιτονίτιδα είναι απειλητική για τη ζωή και προκαλεί σοβαρή νοσηρότητα (Public Health Agency of Canada, 2012).

Ορισμένα στελέχη του *S. aureus* παράγουν το υπεραντιγόνο TSST-1, το οποίο είναι υπεύθυνο για το 75 % των περιπτώσεων συνδρόμου τοξικού σοκ (TSS). Η κλινική εικόνα του TSS είναι σοβαρή και τα οξέα συμπτώματα περιλαμβάνουν υψηλό πυρετό, αγγειακή

κατάρρευση (κατακρήμνιση των περιφερικών αντιστάσεων) (vascular collapse), έμετο, διάρροια, μυαλγία, υπόταση, ερυθματώδη εξανθήματα, απολέπιση, και τη συμμετοχή τουλάχιστον 3 οργάνων. Η θνησιμότητα είναι πολύ υψηλή και ο θάνατος μπορεί να συμβεί μέσα σε 2 ώρες. Το σύνδρομο τοξικού σοκ συσχετίζεται με κολλικό αποικισμό με τον *S. Aureus* να παράγει τοξίνη κατά την έμμηνο ρύση, με επιπλοκές με σταφυλοκοκκική λοίμωξη σε άλλες θέσεις, ή επιπλοκές μετά από χειρουργικές επεμβάσεις (Parsonnet et al., 2005). Εν τω βάθει λοιμώξεις (deep infections) περιλαμβάνουν ενδοκαρδίτιδα, περιτονίτιδα, νεκρωτική πνευμονία, βακτηριαμία, μηνιγγίτιδα, οστεομυελίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα και λοιμώξεις των οστών, των αρθρώσεων και των οργάνων (Fridkin et al., 2005; Public Health Agency of Canada, 2012).

Τα πέντε στάδια στην παθογένεση των λοιμώξεων του *S. Aureus* είναι:

(1) αποικισμός, (2) τοπική λοίμωξη, (3) συστηματική μετάδοση νόσου (μίαση) ή/και σήψη, (4) μεταστατική μόλυνση και (5) τοξίνωση. Περίπου το 30% των υγιών ατόμων έχουν αποικιστεί από *S. aureus*, συνήθως στα ρουθούνια, αλλά επίσης και στον κόλπο και την περιπρωκτική περιοχή. Ο οργανισμός μπορεί να φέρεται ασυμπτωματικά για εβδομάδες ή μήνες στους βλεννογόνους, αλλά μόνο παροδικά φέρεται σε άθικτο δέρμα. Ο αποικισμός πιστεύεται ότι προηγείται της λοίμωξης. Τοπικά αποστήματα του δέρματος ή δομών του δέρματος προκύπτουν, όταν ο οργανισμός εμβολιάζεται στο δέρμα από μία θέση φορέα (site of carriage). Η μόλυνση μπορεί να εξαπλωθεί σε τοπικό επίπεδο [π.χ., μολυσματικό κηρίο, κυτταρίτιδα, πομφολυγώδες μολυσματικό κηρίο (impetigo bullosa), ή λοίμωξη τραύματος] ή μπορεί να αποκτήσει πρόσβαση στο αίμα (Archer, 1998).

Μόλις εισέλθει στο αίμα, ο οργανισμός εξαπλώνεται ευρέως σε περιφερικές θέσεις σε απομακρυσμένα όργανα, και μπορεί να προκύψει σηπτικό σοκ. Χωρίς ειδική θεραπεία, το ποσοστό θνησιμότητας που σχετίζεται με διάχυτη λοίμωξη είναι υψηλό. Ως αποτέλεσμα της αιματογενούς διασποράς, μπορεί να ακολουθήσει ένας αριθμός ειδικών σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων [π.χ., ενδοκαρδίτιδα, οστεομυελίτιδα, νεφρικό μολυσματικό κηρίο (renal carbuncle), σηπτική αρθρίτιδα, ή επί σκληράς μήνιγγας/επισκληρίδιο απόστημα (epidural abscess)]. Τέλος, ακόμη και αν ο ίδιος ο οργανισμός δεν εισβάλλει στην κυκλοφορία του αίματος, ειδικά σύνδρομα μπορούν να προκύψουν από τις τοπικές ή συστηματικές επιδράσεις συγκεκριμένων τοξινών. Παραδείγματα αυτών των συνδρόμων είναι το σύνδρομο τοξικού σοκ, το σύνδρομο της ιχθύωσης ή αποφολιδωτικό του δέρματος (scalded skin syndrome) και η τροφιμογενής γαστρεντερίτιδα. Είναι επίσης εμφανές ότι ορισμένες υποκείμενες νόσοι ή συμπεριφορές μπορούν να προδιαθέτουν άτομα προς λοιμώξεις από σταφυλόκοκκο, περιλαμβανομένου του σακχαρώδους διαβήτη, μόνιμων ενδοφλέβιων καθετήρων,

ενδοφλέβια χρήση απαγορευμένων ουσιών και το AIDS (Archer, 1998).

1.3.2 Παθογένεια *Pseudomonas aeruginosa*

Είναι φθοριζουσα ψευδομονάδα, η οποία ανήκει στα Gram αρνητικά βακτήρια. Τα κύτταρα της διατάσσονται μεμονωμένα, σε ζεύγη ή σε μικρές αλυσίδες. Αν και ταξινομείται στα αερόβια βακτήρια, θεωρείται από πολλούς ως προαιρετικά αναερόβιο, διότι προσαρμόζεται καλά και σε συνθήκες μερικής ή ολικής έλλειψης οξυγόνου (Anthimidou and Mossialos, 2013).



Εικόνα 14. *Pseudomonas aeruginosa*.

Η *P. aeruginosa* προκαλεί ασθένειες σε ζώα, φυτά και στον άνθρωπο. Βρίσκεται στο έδαφος, το νερό και στη χλωρίδα του δέρματος. Είναι ευκαιριακό παθογόνο μικρόβιο για τον άνθρωπο και σημαντική αιτία σοβαρών ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων (Bailey et al., 2000; Rahme et al., 2000), όπως ουρολοιμώξεις, μηνιγγίτιδα, λοιμώξεις από καθετήρες, σηψαιμία, πνευμονία κ.α. ειδικά σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς ή σε ασθενείς με προδιάθεση (Khan et al., 2000; Unseld et al., 2000). Επίσης μπορεί να προκαλέσει και άλλες λοιμώξεις όπως ωτίτιδα, λοιμώξεις τραυμάτων, επιπεφυκίτιδα κ.α. Λοιμώξεις από *Pseudomonas aeruginosa* παρατηρούνται κυρίως σε ασθενείς που πάσχουν από λευχαιμία ή άλλες νεοπλασίες, σε άτομα που έχουν υποστεί εγκαύματα, σε άτομα που πάσχουν από ινοκυστική νόσο, σε άτομα που έχουν υποστεί μεγάλες χειρουργικές επεμβάσεις και σε ασθενείς που θεραπεύονται με ακτινοβολίες, αντιβιοτικά και ανοσοκατασταλτικά φάρμακα. Αν προσβάλλει κρίσιμα όργανα όπως πνεύμονες, ουρικό σύστημα και νεφρά, τα αποτελέσματα μπορεί να είναι θανατηφόρα. Το βακτήριο είναι ανθεκτικό σε πολλά από τα συνήθη αντιβιοτικά, άρα η χημειοθεραπεία είναι συχνά δύσκολη. Η ανθεκτικότητα του οφείλεται συνήθως σε ένα πλασμίδιο μεταφοράς ανθεκτικότητας (πλασμίδιο R), το οποίο φέρει γονίδια που κωδικεύουν την αδρανοποίηση της τοξικότητας διαφόρων αντιβιοτικών. Σε υγιείς ανθρώπους μπορούμε να την βρούμε στο φάρυγγα (0-7%), στα πτύελα (2%) και στα κόπρανα (3-24%) ενώ στους νοσοκομειακούς ασθενείς μπορεί να ανευρεθεί σε ακόμη μεγαλύτερα ποσοστά. Πολύ καλύτερα αναπτύσσεται σε υγρό και θερμό περιβάλλον και έτσι το νοσοκομειακό περιβάλλον παρέχει απεριόριστες εστίες ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

Η *P. aeruginosa* παράγει διάφορες χρωστικές ουσίες όπως πυοκυανίνη, πυορουμπίνη, πυομελανίνη, και φθορεσεΐνη. Περισσότερα από το 50% των στελεχών *P. aeruginosa* παράγουν την υδατοδιαλυτή χρωστική πυοκυανίνη, η οποία έχει χρώμα κυανοπράσινο και χαρακτηρίζει τα στελέχη της *P. aeruginosa* χωρίς να χρειάζονται περισσότερες βιοχημικές δοκιμασίες για την ταυτοποίηση τους.

Είναι σχεδόν αδύνατο να αποφευχθεί η έκθεση στην *P. aeruginosa*, επειδή αυτή μπορεί να βρεθεί οπουδήποτε. Είναι μη απαιτητικός οργανισμός (non-fastidious) και απαιτεί λίγα όσον αφορά τις διατροφικές απαιτήσεις, και συνεπώς μπορεί να βρεθεί σε άψυχα αντικείμενα, όπως νεροχύτες, χώρους νοσοκομείου, τουαλέτες, ντους και εξοπλισμό φροντίδας των ασθενών, ιδιαίτερα αναπνευστήρες. Ακόμη και οι επιφάνειες των φρέσκων φρούτων και λαχανικών ενδέχεται να φέρουν την *P. aeruginosa*. Ο οργανισμός έχει μια ιδιαίτερη προτίμηση για το νερό και, ως αποτέλεσμα, έχει απομονωθεί από σαπούνια και απολυμαντικά, διαλύματα φακών επαφής, καλλυντικά, τα οποία έχουν τεκμηριωθεί ως πηγές μόλυνσης (Flaws and Moore, 2011).

Η *P. aeruginosa* μπορεί να προκαλέσει μόλυνση σε σχεδόν οποιοδήποτε μέρος του σώματος, αν και τυπικά δεν προκαλεί μόλυνση σε έναν υγιή ξενιστή. Οι άνθρωποι που είναι πιο επιρρεπείς σε λοιμώξεις από *P. aeruginosa*, είναι εκείνοι των οποίων οι βλεννώδεις μεμβράνες ή το δέρμα παρουσιάζουν κάποια ανεπάρκεια, έτσι ώστε να μην χρησιμεύουν πλέον ως ένα φυσικό εμπόδιο για τη μόλυνση (π.χ. σε ασθενείς με εγκαύματα). Η ουδετεροπενία ή άλλη ανοσοανεπάρκεια, προδιαθέτει τους ασθενείς προς μόλυνση με πολλούς διαφορετικούς οργανισμούς, μεταξύ των οποίων και η *P. aeruginosa*. Το μοναδικό περιβάλλον στον πνεύμονα, που εμφανίζεται σε ασθενείς με κυστική ίνωση, προωθεί μια χρόνια λοίμωξη με *P. aeruginosa*, στην οποία ο οργανισμός εμφανίζει έναν χαρακτηριστικό βλεννώδη φαινότυπο, ο οποίος οφείλεται στην παραγωγή του αλγινικού που περιβάλλει μικροαποικίες του οργανισμού. Νοσηλευόμενοι ασθενείς που πάσχουν από καρδιαγγειακή νόσο, καρκίνο ή διαβήτη και ιδιαίτερα ασθενείς με μηχανικό αναπνευστήρα, είναι πιθανό να πάθουν πνευμονία ή βακτηριαμία εξαιτίας της *P. aeruginosa*. (Qarah et al., 2013; Anthimidou and Mossialos, 2013; Flaws and Moore, 2011).

Οι λοιμώξεις που σχετίζονται με την παροχή υγειονομικής περίθαλψης ή ιατρογενείς λοιμώξεις (Healthcare-associated infections, HAI) από την *P. Aeruginosa*, συνήθως αποδίδονται στην απόκτηση του οργανισμού κατά την παραμονή στο νοσοκομείο. Ενώ η εξωγενής εξάπλωση του οργανισμού από το περιβάλλον του νοσοκομείου στον ασθενή συμβαίνει, υπάρχει επίσης ενδογενής εξάπλωση του οργανισμού από μια θέση αποικισμού σε μια θέση παθογένεσης. Έτσι, ένας αποικισμένος ασθενής δεν αποτελεί μόνο κίνδυνο για τους

άλλους ως πηγή της μόλυνσης, αλλά επίσης και για τον εαυτό τους, κάτι που δεν λαμβάνεται πάντα υπόψη στην πρόληψη των νοσοκομειακών λοιμώξεων, τουλάχιστον για την *P. aeruginosa* (Bonten et al., 1999). Η φορεία (carriage) από ανθεκτικό στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA) αναγνωρίστηκε αρκετά χρόνια πριν, ως πηγή των νοσοκομειακών λοιμώξεων από MRSA. Η συνειδητοποίηση αυτή οδήγησε στην υιοθέτηση πρωτοκόλλων διαλογής για τον εντοπισμό τους φορέων πριν από την εισαγωγή και μετά τη θεραπεία αυτών των ασθενών με ενδορρινική μουπιροκίνη ή άλλους παράγοντες. (Van Rijen et al., 2008). Η αναγνώριση και θεραπεία των φορέων του MRSA οδήγησε σε σημαντική μείωση του ποσοστού των μετεγχειρητικών λοιμώξεων που οφείλονται στον *S. aureus*. Η αύξηση των ανθεκτικών στα φάρμακα *P. aeruginosa*, τα οποία προκαλούν HAI, έχει παρατηρηθεί τουλάχιστον τα τελευταία δεκαπέντε χρόνια. Η Μελέτη Επιτήρησης Μονάδων Εντατικής Θεραπείας, χρησιμοποιώντας δεδομένα που συλλέγονται από ΜΕΘ σε όλες τις ΗΠΑ, καθώς και μια άλλη μελέτη επιτήρησης που διενεργείται σε ένα νοσοκομείο, διαπίστωσαν ότι η πολυφαρμακευτική αντοχή, ορίζεται ως αντίσταση στα [μεγαλύτερη ή ίση με] 3 από τα ακόλουθα φάρμακα: κεφταζιντίμη (cefazidime), σιπροφλοξασίνη, μιπενέμη και τοβραμυκίνη (tobramycin), η οποία αυξήθηκε από περίπου 4% το 1993, σε σχεδόν 14% το 2002 (Flaws and Moore, 2011; Obritsch et al., 2004).

Η *P. aeruginosa* είναι ένας ευκαιριακός, που δεν ζυμώνει τη γλυκόζη (nonfermentive), gram-αρνητικός βάκιλος, που είναι υπεύθυνος για μία ευρεία ποικιλία λοιμώξεων στον άνθρωπο, που κυμαίνονται από σχετικά μη επιπλεγμένες λοιμώξεις της ουροφόρου οδού (relatively uncomplicated urinary tract infections, UTIs) έως σοβαρή και απειλητικές για τη ζωή λοιμώξεις, συμπεριλαμβανομένης της νεογνικής σήψης και χρόνιων λοιμώξεων των πνευμόνων σε ασθενείς με κυστική ίνωση. Η *P. aeruginosa* παράγει μια σειρά από μολυσματικούς παράγοντες που δεσμεύονται σε μεμβράνη και εκκρίνονται, οι οποίοι βοηθούν στην προσκόλληση του οργανισμού σε κύτταρα ξενιστή, στην εισβολή του ιστού και την αναστολή της ανοσοαπόκρισης.

Συμπερασματικά, η *P. aeruginosa* παραμένει ένα σοβαρό πρόβλημα υγείας. Ο οργανισμός είναι πανταχού παρών στη φύση, εξαιρετικά ανθεκτικός και προσαρμοστικός σε μια ευρεία ποικιλία από περιβάλλοντα. Ενώ δεν αποτελεί μείζον παθογόνο σε ανοσοεπαρκή ξενιστή, αποτελεί μια σημαντική αιτία HAI σε υποβαθμισμένους ξενιστές. Οι HAI εξαιτίας της *P. aeruginosa* μειώνονται, αλλά το ποσοστό των αντιμικροβιακών ανθεκτικών στελεχών αυξάνεται. Η *P. aeruginosa* παρουσιάζει φυσική αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά και μπορεί να αναπτύξει εύκολα νέους μηχανισμούς αντοχής μετά από έκθεση σε αντιμικροβιακούς παράγοντες (Flaws and Moore, 2011).

1.4 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί η αναστολή δημιουργίας βιοϋμένων κάποιων κλινικών βακτηριακών στελεχών και συγκεκριμένα ανθεκτικών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus*, παρουσία αντιβακτηριακών Ελληνικών μελιών, συγκρινόμενα με το μέλι *Manuka*.

2. Πειραματικό μέρος

2.1 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήσαμε κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας ήταν:

- Τρυβλία Petri (100mm)
- Μικροπλάκες 96 θέσεων (microplates)
- Αποστειρωμένα πλαστικά φιαλίδια τύπου falcon των 50ml
- Θρεπτικό υλικό *Nutrient Agar*
- Θρεπτικό υλικό *Luria Bertani Broth (LB)*
- Θρεπτικό υλικό *Mueller Hinton Broth*
- Πιπέτες Pasteur
- Eppendorfs
- Γυάλινα φιαλίδια (vials)

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήσαμε σε αυτή τη πειραματική διαδικασία είναι:

- *Pseudomonas aeruginosa* (P1743 ανθεκτικό σε καρβαπενέμες)
- *Staphylococcus aureus* (ανθεκτικό σε μεθικιλίνη)

2.1.1 Δείγματα μελιών

Τα μέλια που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Εξετάστηκαν τα παρακάτω δείγματα μελιών (Πίνακας 1). Κάθε δείγμα κατείχε ένα νούμερο κωδικό και λεπτομέρειες για τη φυτική πηγή του. Τα δείγματα μελιού ήταν αποθηκευμένα σε γυάλινα ή πλαστικά δοχεία σε θερμοκρασία δωματίου σε κλειστό χώρο.

Πίνακας 1. Δείγματα μελιών.

A/A	ΤΥΠΟΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΠΑΡΑΓΩΓΟΣ
1	ΡΕΙΚΙ ΚΩΝΟΦΟΡΟ	20 ΜΑΙΟΥ 2009	Δρυμός Σκυρίτιδος Βλαχοκερασιά Αρκαδίας	Ρουμελιώτης Βασίλειος Αρκαδικό Μέλι
2	ΕΛΑΤΟ ΜΑΙΝΑΛΟΥ	15/6/2010	Λειβιδίου	Ρουμελιώτης Βασίλειος Αρκαδικό Μέλι
5	ΚΟΥΜΑΡΙΑ ΚΑΙ ΡΕΙΚΙ	30/11/2010	Καλτεζές Αρκαδίας	Ρουμελιώτης Βασίλειος Αρκαδικό Μέλι
6	ΚΑΣΤΑΝΙΑ	ΙΟΥΛΙΟΣ 2009	Άνω Δόλνα Αρκαδίας	Ρουμελιώτης Βασίλειος Αρκαδικό Μέλι
7	ΠΕΥΚΟΜΕΛΟ	2010	Θάσος	κ.Δρακάκη
10	ΑΓΡΙΟΒΟΤΑΝΑ ΚΑΙ ΘΥΜΑΡΙ	2010	Α.Όλυμπος	Αρβανίτης Μελίχρυσος
11	ΚΟΥΜΑΡΙΑ	2010	Νότιο Πήλιο	Αρβανίτης Μελίχρυσος
12	ΑΝΘΟΜΕΛΟ: ΠΟΛΥΚΟΜΠΟ ΚΑΙ ΚΡΟΚΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2009	Κρόκος Κοζάνης	Λαμπάδας Βάιος
14	ΑΝΘΟΜΕΛΟ	ΙΟΥΛΙΟΣ 2010	Βούρικας	Λαμπάδας Βάιος
15	ΠΟΛΥΚΟΜΠΟΣ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2010	Γύρω από λίμνη Κερκίνη, Κεντρική Μακεδονία	Αρβανίτης Μελίχρυσος
19	ΗΛΙΑΝΘΟΣ	2010	Κομοτηνή	Αγροτικός Μελισσοκομικός συναιτερισμός Νικήτης Χαλκιδικής
22	ΘΥΜΑΡΙ: γυρεόκκοκοι 30%	2010	Κρήτη	Αγροτικός Μελισσοκομικός συναιτερισμός Νικήτης Χαλκιδικής
23	ΚΑΣΤΑΝΙΑ με λίγο πεύκο	2010	Άγιο Όρος	Αγροτικός Μελισσοκομικός συναιτερισμός Νικήτης Χαλκιδικής
26	ΜΕΛΙ ΑΝΘΕΩΝ: ΑΓΡΙΑ ΡΙΓΑΝΗ ΚΑΙ ΑΓΡΙΟ ΤΡΙΦΥΛΛΙ	2010	Ορεινά λιβάδια και δάση του Ολύμπου	Σαμαράς Γιώργος Κέντρο Μελισσοκομίας Θεσσαλίας (Βόλος)
27	ΚΑΣΤΑΝΙΑ	2010	Πήλιο	Σαμαράς Γιώργος Κέντρο Μελισσοκομίας Θεσσαλίας (Βόλος)

				Παραγωγός: Ελευθερία Κασσαβέτη
31	KOYMAPIA	2010	Μελιβία	Ιωάννα Στρούλια

Μέλι Manuka: Το μέλι Manuka είναι της εταιρείας Manuka Health New Zealand με UMF ("Unique Manuka Factor"), 25+ και MGO (μεθυλγλοξάλη) 550. Το μέλι αυτό χρησιμοποιήθηκε σαν θετικό control, αφού η αντιμικροβιακή του δράση είναι πολλάκις διαπιστωμένη (Jenkins and Cooper, 2012).

Συνθετικό μέλι:

Το τεχνητό μέλι φτιάχτηκε στο εργαστήριο και χρησιμοποιήθηκε σαν αρνητικό control. Ζυγίστηκαν και διαλύθηκαν 3.0g σουκρόζης, 15g μαλτόζης, 80,1g φρουκτόζης και 67g γλυκόζης σε 34 ml απιονισμένο νερό (Sherlock, 2010). Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 56°C μέχρι να διαλυθεί. Αυτό το διάλυμα αντιπροσωπεύει τα τέσσερα κύρια σάκχαρα που βρίσκονται στο μέλι.

2.2 Μέθοδοι

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την διερεύνηση αναστολής βιοϋμένων κλινικών βακτηριακών στελεχών παρουσία μελιού είναι η δοκιμασία σχηματισμού βιοϋμένων των βακτηριακών στελεχών σε συγκεντρώσεις μελιού κάτω της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*minimum inhibitory concentration, MIC*) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (*microtiter plates*). Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε για τα βακτήρια *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus*.

2.2.1. Προετοιμασία καλλιέργειας *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus*

2.2.1.1 Stock Γλυκερόλης

Η γλυκερόλη ή γλυκερίνη είναι μία απλή πολυολική ένωση. Πρόκειται για ένα άχρωμο, άοσμο, παχύρρευστο υγρό με χαμηλή τοξικότητα, που χρησιμοποιείται ευρέως σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Η γλυκερόλη έχει τρεις ομάδες υδροξυλίου που είναι υπεύθυνες για την διαλυτότητά της στο νερό και την υγροσκοπική της φύση. Η ραχοκοκαλιά της γλυκερίνης είναι το επίκεντρο όλων των λιπιδίων, γνωστών ως τριγλυκερίδια (Christophe et al., 2006).

Η αποθήκευση βακτηρίων σε stock γλυκερόλης 25%, επιτυγχάνεται έτσι ώστε να διατηρούνται τα βακτήρια ζωντανά σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Η διαδικασία γίνεται ως εξής:

- Τοποθέτηση 1,5ml υγρής βακτηριακής καλλιέργειας σε eppendorf.
- Φυγοκέντρωση σε 12000rpm για 3 λεπτά.
- Απόρριψη υπερκείμενου και προσθήκη 1ml φρέσκου LB.
- Vortex.
- Προσθήκη 300-350μl γλυκερόλης.
- Vortex.
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα.
- Διατήρηση στους -80°C όπου και παρέμειναν σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

2.2.1.2 Nutrient Agar

Είναι ένα θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται για στερεό θρεπτικό υπόστρωμα σε τρυβλία και για καλλιέργεια μη απαιτητικών σε διατροφικά στοιχεία οργανισμών.

Για την παρασκευή 1000 ml θρεπτικού μέσου, ζυγίστηκαν 21,5 gr Nutrient Agar και προστέθηκαν σε 1 λίτρο απιονισμένο νερό. Έπειτα, αφού έγινε καλή ανάδευση για μερικά λεπτά, πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στους 120°C για 23 λεπτά. Το διάλυμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου μετά την αποστείρωση, έτσι ώστε να φτάσει τους 47°C περίπου και στη συνέχεια, μοιράστηκε σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri, υπό ασηπτικές συνθήκες, πριν στερεοποιηθεί.

Η δημιουργία στερεής καλλιέργειας για κάθε βακτήριο έγινε με τον εξής τρόπο:

Με μικροβιολογικό κρίκο και σε αποστειρωμένο περιβάλλον, παίρνεται μια μικρή ποσότητα βακτηρίων από την καλλιέργεια stock και τοποθετείται σε τρυβλία Petri με θρεπτικό μέσο Nutrient Agar. Έγινε επίστρωση των βακτηρίων στα τρυβλία και τοποθετήθηκαν για επώαση σε κλίβανο στους 37°C για 24 ώρες.

2.2.1.3 α Luria Bertani Broth (LB)

Το LB Broth είναι ένα διατροφικά πλούσιο μέσο που χρησιμοποιείται για υγρές καλλιέργειες. Είναι ένα από τα πιο συνηθισμένα μέσα καλλιέργειας στο εργαστήριο, κυρίως για στελέχη του βακτηρίου *Escherichia coli*. Υπάρχουν πολλά διαφορετικά σκευάσματα αυτού του θρεπτικού μέσου, όμως γενικά, μοιράζονται πολλά κοινά συστατικά όπως

πεπτόνες της καζεΐνης, βιταμίνες (συμπεριλαμβανομένου αυτών του συμπλέγματος B), ιχνοστοιχεία (άζωτο, θείο, μαγνήσιο) και μεταλλικά στοιχεία (Nikaido, 2009).

Για την παρασκευή 1000ml θρεπτικού μέσου, ζυγίστηκαν 25gr LB Broth και προστέθηκαν σε 1 λίτρο απιονισμένο νερό. Έπειτα, αφού έγινε καλή ανάδευση για μερικά λεπτά, μοιράστηκαν 5ml του θρεπτικού μέσου σε κάθε ένα από τα μικρότερα μπουκαλάκια (vials) και πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στους 120°C για 23 λεπτά. Τα vials τοποθετήθηκαν στο ψυγείο στους 4°C.

Η δημιουργία υγρής καλλιέργειας για κάθε βακτήριο έγινε με τον εξής τρόπο:

Από τη στερεή καλλιέργεια πήραμε, από τα τρυβλία που αναπτύχθηκαν τα βακτήρια με μικροβιολογικό κρίκο και σε ασηπτικό περιβάλλον, ένα κομμάτι από τις αποικίες τους και τοποθετήθηκαν σε vials με θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient broth. Έτσι το vial με τη μικρή ποσότητα βακτηρίων (υγρή καλλιέργεια), τοποθετήθηκε σε επωαστήρα υπό ανάδευση (incubator shaker) για 24 ώρες στους 37°C στις 210 στροφές.

2.2.1.3 β Mueller Hinton Broth

Το Mueller Hinton Broth είναι ένα διατροφικά πλούσιο μέσο που χρησιμοποιείται για υγρές καλλιέργειες. Για την παρασκευή 1000 ml θρεπτικού μέσου, ζυγίστηκαν 21gr Mueller Hinton Broth και προστέθηκαν σε 1 λίτρο απιονισμένο νερό. Έπειτα, αφού έγινε καλή ανάδευση για μερικά λεπτά και πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στους 120°C για 23 λεπτά. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στο ψυγείο στους 4°C.

Η δημιουργία υγρής καλλιέργειας για κάθε βακτήριο έγινε με τον εξής τρόπο:

Από τη στερεή καλλιέργεια πήραμε, από τα τρυβλία που αναπτύχθηκαν τα βακτήρια με μικροβιολογικό κρίκο και σε ασηπτικό περιβάλλον, ένα κομμάτι από τις αποικίες τους και τοποθετήθηκαν σε vials με θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient broth. Έτσι το vial με τη μικρή ποσότητα βακτηρίων (υγρή καλλιέργεια), τοποθετήθηκε σε επωαστήρα υπό ανάδευση (incubator shaker) για 24 ώρες στους 37°C στις 210 στροφές.

2.2.1.4 Αραίωση υγρής βακτηριακής καλλιέργειας και φωτομέτρηση

Στη συνέχεια οι καλλιέργειες αραιώνονται μέχρι την παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος θολερότητας ίση με 0.5 McFarland (περίπου $1,5 \cdot 10^8$ cfu/ml). Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας OD γίνεται στα 600 nm με φασματοφωτόμετρο, μέχρι να πετύχουμε τελική τιμή 0.132, η οποία αντιστοιχεί σε 0.5 McFarland.

2.2.2 Δοκιμασία αναστολής βιοϋμένων κλινικών βακτηριακών στελεχών παρουσία μελιού

2.2.2.1 Αρχή της μεθόδου

Αρχικά προετοιμάστηκαν οι καλλιέργειες των δύο βακτηρίων χρησιμοποιώντας καλλιέργειες (glycerol stock) που διατηρούνται στους -80°C . Με μικροβιολογικό κρίκο και σε αποστειρωμένο περιβάλλον, πήραμε μια μικρή ποσότητα βακτηρίων από το stock, που διατηρείται στους -80°C και τις τοποθετήσαμε σε vials, που περιείχε 5ml θρεπτικού υποστρώματος *LB*. Τα vials τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα υπό ανάδευση στους 37°C για 24 ώρες στις 210 στροφές/min. Έπειτα οι καλλιέργειες αραιώθηκαν, μέχρι την παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος, θολερότητας ίση με 0,5 McFarland (περίπου $1,5 \cdot 10^8 \frac{\text{cfu}}{\text{ml}}$). Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600nm, έγινε μέχρι να πετύχουμε τιμή 0,132 η οποία αντιστοιχεί σε 0,5 McFarland (περίπου $1,5 \cdot 10^8 \frac{\text{cfu}}{\text{ml}}$). Γίνεται επιπλέον προσαρμογή (αραιώση ή συμπύκνωση), όπου χρειάζεται, με σκοπό η κάθε καλλιέργεια να έχει OD ~ 0,3.

Με βάση μιας προγενέστερης μελέτης όπου προσδιορίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC), τα δείγματα των μελιών χρησιμοποιήθηκαν για την *Pseudomonas aeruginosa* και αντίστοιχα για τον *Staphylococcus aureus*, αραιώθηκαν σε διαδοχικές συγκεντρώσεις και χρησιμοποιήθηκαν δυο αραιώσεις κάτω από την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση. Οι συγκεντρώσεις μελιού που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον πίνακα 2:

Πίνακας 2. Ποσοστιαίες συγκεντρώσεις δειγμάτων μελιού v/v

Δείγματα μελιού		Συγκέντρωση % v/v	
MANUKA		Συγκέντρωση 3,125% v/v	Συγκέντρωση 1,56% v/v
ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ		Συγκέντρωση 3,125% v/v	Συγκέντρωση 1,56% v/v
1	ΡΕΙΚΙ ΚΩΝΟΦΟΡΟ	Συγκέντρωση 3,125% v/v	Συγκέντρωση 1,56% v/v
2	ΕΛΑΤΟ ΜΑΙΝΑΛΟΥ	Συγκέντρωση 3,125% v/v	Συγκέντρωση 1,56% v/v
5	ΚΟΥΜΑΡΙΑ ΚΑΙ ΡΕΙΚΙ	Συγκέντρωση 3,125% v/v	Συγκέντρωση 1,56% v/v
6	ΚΑΣΤΑΝΙΑ	Συγκέντρωση 3,125% v/v	Συγκέντρωση 1,56% v/v

7	ΠΕΥΚΟΜΕΛΟ	Συγκέντρωση 1,56% v/v	Συγκέντρωση 0,78% v/v
10	ΑΓΡΙΟΒΟΤΑΝΑ ΚΑΙ ΘΥΜΑΡΙ	Συγκέντρωση 12,5% v/v	Συγκέντρωση 6,25% v/v
11	ΚΟΥΜΑΡΙΑ	Συγκέντρωση 3,125% v/v	Συγκέντρωση 1,56% v/v
12	ΑΝΘΟΜΕΛΟ: ΠΟΛΥΚΟΜΠΟ ΚΑΙ ΚΡΟΚΟΣ	Συγκέντρωση 3,125% v/v	Συγκέντρωση 1,56% v/v
14	ΑΝΘΟΜΕΛΟ ΑΠΟ ΒΟΥΡΙΚΑ	Συγκέντρωση 1,56% v/v	Συγκέντρωση 0,78% v/v
15	ΠΟΛΥΚΟΜΠΟΣ	Συγκέντρωση 3,125% v/v	Συγκέντρωση 1,56% v/v
19	ΗΛΙΑΝΘΟΣ	Συγκέντρωση 1,56% v/v	Συγκέντρωση 0,78% v/v
22	ΘΥΜΑΡΙ: ΓΥΡΕΟΚΟΚΚΟΙ 30%	Συγκέντρωση 3,125% v/v	Συγκέντρωση 1,56% v/v
23	ΚΑΣΤΑΝΙΑ με λίγο πεύκο	Συγκέντρωση 1,56% v/v	Συγκέντρωση 0,78% v/v
26	ΜΕΛΙ ΑΝΘΕΩΝ: ΑΓΡΙΑ ΡΙΓΑΝΗ ΚΑΙ ΑΓΡΙΟ ΤΡΙΦΥΛΛΙ	Συγκέντρωση 3,125% v/v	Συγκέντρωση 1,56% v/v
27	ΚΑΣΤΑΝΙΑ ΠΗΛΙΟ	Συγκέντρωση 3,125% v/v	Συγκέντρωση 1,56% v/v
31	ΚΟΥΜΑΡΙΑ ΜΕΛΙΒΟΙΑ	Συγκέντρωση 3,125% v/v	Συγκέντρωση 1,56% v/v

Στη πλάκα μικροτιτλοποίησης, το κάθε μέλι (συμπεριλαμβανομένου του Manuka και του συνθετικού), χρησιμοποιήθηκε εις τετραπλού για το κάθε βακτήριο και για κάθε συγκέντρωση μελιού. Στο καθένα από αυτά προστέθηκε 200μl από την αραιώση του εκάστοτε υπό εξέταση μελιού και $5 \cdot 10^4$ CFUs καλλιέργειας. Για θετικό control χρησιμοποιήσαμε θρεπτικό υλικό *Muller Hinton Broth* μαζί με $5 \cdot 10^4$ CFUs καλλιέργειας.

Φωτομετρείται το microtiter plate στα 630nm και οι μετρήσεις ορίζονται ως t0. Το plate επωάζεται για 48 ώρες στους 30°C. Στη συνέχεια, φωτομετρείται στα 630nm και οι μετρήσεις ορίζονται ως t48. Οι φωτομετρήσεις των microtiter plates έγιναν με το πρόγραμμα Gen5. Απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο από κάθε microtiter plate και σε κάθε πηγαδάκι προστίθενται 200μl της χρωστικής κρυσταλλικό ιώδες. Για την παρασκευή 100ml διαλύματος κρυσταλλικού ιώδους, ζυγίστηκαν 25gr κρυσταλλικού ιώδους και προστέθηκαν σε 100ml

απιονισμένου νερού. Έπειτα, έγινε καλή ανάδευση για μερικά λεπτά.

Το plate αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5min. Ξεπλένεται 7-8 φορές με απιονισμένο νερό και στεγνώνει σε θερμοκρασία δωματίου overnight. Για να απομακρυνθούν τα βακτηριακά κύτταρα που έχουν βαφεί με κρυσταλλικό ιώδες, προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι 200μl ενός μίγματος αιθανόλης και ακετόνης, σε αναλογία 1:1. Μεταφέρονται 20μl από το κάθε πηγαδάκι σε καινούργιο microtiter plate, και προστίθενται 180μl του μίγματος αιθανόλης-ακετόνης 1:1 (αρά ο συντελεστής αραίωσης είναι 1/10). Το καινούργιο plate φωτομετρείται στα 630nm και οι μετρήσεις ορίζονται ως t' . Οι φωτομετρήσεις των microtiter plates έγιναν με το πρόγραμμα Gen5.

Πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων ενώ έπειτα έγιναν 2 επαναλήψεις του πειράματος. Για να γίνει η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

$$\frac{t'}{t_{48} - t_0}$$

Χρήση αυτού του τύπου έγινε για κάθε βακτήριο παρουσία διαφορετικών δειγμάτων μελιού (συμπεριλαμβανομένου του Manuka και του Συνθετικού). Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του παραπάνω τύπου διαιρέθηκαν με το control (σκέτο θρεπτικό υλικό *Muller Hinton Broth*) και υπολογίστηκε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση.

Εάν υποθέσουμε πως το control θεωρείται το 100% παραγωγής βιοϋμένα, και το βακτηριακό στέλεχος μαζί με το μέλι N1 αραίωσης 3,125 βρίσκεται στο 89% στο βακτηριακό στέλεχος *Staphylococcus aureus* ενώ βρίσκεται στο 46% στην *Pseudomonas aeruginosa*, τότε η παραγωγή βιοφίλμ είναι μειωμένη κατά 11% και 56% αντίστοιχα. Αντίστοιχα, βρέθηκε το ποσοστό αναστολής σε όλα τα δείγματα μελιού στις δυο διαδοχικές αραιώσεις κάτω από την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) και για τα δύο βακτηριακά στελέχη.

Για τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, έγιναν αρκετές επιπλέον επαναλήψεις, τα αποτελέσματα των οποίων συμφωνούσαν με τα ανωτέρω αποτελέσματα.

3. Αποτελέσματα

3.1 Δοκιμασία αναστολής σχηματισμού βιοϋμένα

3.1.1 Δοκιμασία αναστολής σχηματισμού βιοϋμένα του βακτηρίου *Staphylococcus aureus*

Παρατηρήσαμε πως το μέλι αναφοράς Manuka εμφανίζει πολύ χαμηλότερο ποσοστό αναστολής βιοϋμένα στον *Staphylococcus aureus* σε σύγκριση με κάποια ελληνικά δείγματα μελιού. Συγκεκριμένα, το υψηλότερο ποσοστό αναστολής βιοϋμένα στον *Staphylococcus aureus* εμφανίζει το μέλι N26 στην συγκέντρωση 1,56% v/v με ποσοστό $(39 \pm 12)\%$ v/v. Ενώ το χαμηλότερο ποσοστό αναστολής εμφανίζει το μέλι N5 στην συγκέντρωση 1,56% v/v με ποσοστό $(6 \pm 5)\%$ v/v. Το συνθετικό μέλι εμφανίζει σχεδόν διπλάσια αναστολή του βιοϋμένα στον *Staphylococcus aureus* σε σύγκρισή το μέλι Manuka. Μεταξύ των δειγμάτων μελιού που χρησιμοποιήθηκαν, τα ποσοστά αναστολής του βιοϋμένα του *Staphylococcus aureus* με αύξουσα σειρά είναι τα παρακάτω:

N: 5 < Manuka < 7 < 6 < 1 < 27 < 19 < 22 < 2 < 14 < 12 < συνθετικό < 15 < 11 < 23 < 31 < 10 < 26

Πίνακας 3. Ποσοστά αναστολής σχηματισμού βιοϋμένα στο βακτήριο *Staphylococcus aureus*

Δείγματα μελιού		Συγκέντρωση 12,5% v/v	Συγκέντρωση 6,25% v/v	Συγκέντρωση 3,125% v/v	Συγκέντρωση 1,56% v/v	Συγκέντρωση 0,78% v/v	Συγκέντρωσεις % v/v
MANUKA				$(9 \pm 9)\%$ v/v	$(8 \pm 5)\%$ v/v		Αναστολή βιοϋμένα %
ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ				$(21 \pm 16)\%$ v/v	$(14 \pm 12)\%$ v/v		Αναστολή βιοϋμένα %
1	ΡΕΙΚΙ ΚΩΝΟΦΟΡΟ			$(11 \pm 7)\%$ v/v	$(15 \pm 12)\%$ v/v		Αναστολή βιοϋμένα %
2	ΕΛΑΤΟ ΜΑΙΝΑΛΟΥ			$(15 \pm 12)\%$ v/v	$(22 \pm 13)\%$ v/v		Αναστολή βιοϋμένα %
5	ΚΟΥΜΑΡΙΑ ΚΑΙ ΡΕΙΚΙ			$(11 \pm 9)\%$ v/v	$(6 \pm 5)\%$ v/v		Αναστολή βιοϋμένα %
6	ΚΑΣΤΑΝΙΑ			$(10 \pm 4)\%$ v/v	$(12 \pm 7)\%$ v/v		Αναστολή βιοϋμένα %
7	ΠΕΥΚΟΜΕΛΟ				$(10 \pm 2)\%$ v/v	$(13 \pm 5)\%$ v/v	Αναστολή βιοϋμένα %
10	ΑΓΡΙΟΒΟΤΑΝΑ ΚΑΙ ΘΥΜΑΡΙ	$(28 \pm 6)\%$ v/v	$(33 \pm 17)\%$ v/v				Αναστολή βιοϋμένα %
11	ΚΟΥΜΑΡΙΑ			$(24 \pm 14)\%$ v/v	$(21 \pm 1)\%$ v/v		Αναστολή βιοϋμένα %

12	ΑΝΘΟΜΕΛΟ: ΠΟΛΥΚΟΜΠΟ ΚΑΙ ΚΡΟΚΟΣ			(19±13) % v/v	(31±7) % v/v		Αναστολή βιοϋμένα %
14	ΑΝΘΟΜΕΛΟ ΑΠΟ ΒΟΥΡΙΚΑ				(17±8) % v/v	(29±10) % v/v	Αναστολή βιοϋμένα %
15	ΠΟΛΥΚΟΜΠΟΣ			(24±6) % v/v	(13±7) % v/v		Αναστολή βιοϋμένα %
19	ΗΛΙΑΝΘΟΣ				(15±6)% v/v	(22±12) % v/v	Αναστολή βιοϋμένα %
22	ΘΥΜΑΡΙ: ΓΥΡΕΟΚΟΚΚΟΙ 30%			(15±8) % v/v	(32±10) % v/v		Αναστολή βιοϋμένα %
23	ΚΑΣΤΑΝΙΑ με λίγο πεύκο				(26±15) % v/v	(14±12) % v/v	Αναστολή βιοϋμένα %
26	ΜΕΛΙ ΑΝΘΕΩΝ: ΑΓΡΙΑ ΡΙΓΑΝΗ ΚΑΙ ΑΓΡΙΟ ΤΡΙΦΥΛΛΙ			(33±17) % v/v	(39±12) % v/v		Αναστολή βιοϋμένα %
27	ΚΑΣΤΑΝΙΑ ΠΗΛΙΟ			(12±10) % v/v	(9±8) % v/v		Αναστολή βιοϋμένα %
31	ΚΟΥΜΑΡΙΑ ΜΕΛΙΒΟΙΑ			(27±16) % v/v	(24±18) % v/v		Αναστολή βιοϋμένα %

3.1.2 Δοκιμασία αναστολής σχηματισμού βιοϋμένα του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*

Τα αποτελέσματα δείχνουν πως κάποια ελληνικά δείγματα εμφανίζουν υψηλότερη αναστολή από το μέλι αναφοράς Manuka. Συγκεκριμένα, το υψηλότερο ποσοστό αναστολής βιοϋμένα στον *Pseudomonas aeruginosa* εμφανίζουν τα μέλια N1 και N15 σε συγκέντρωση 3,125% v/v με ποσοστό (54±7)% v/v και (54±22)% v/v αντίστοιχα. Ενώ το χαμηλότερο ποσοστό αναστολής εμφανίζει το μέλι N10 στη συγκέντρωση 6,25% v/v, με ποσοστό (10±6)% v/v. Το συνθετικό μέλι και το μέλι Manuka εμφανίζουν παρόμοιο ποσοστό αναστολής βιοϋμένα. Μεταξύ των δειγμάτων μελιού που χρησιμοποιήθηκαν, τα ποσοστά αναστολής του βιοϋμένα του *Pseudomonas aeruginosa* με αύξουσα σειρά είναι τα παρακάτω:

N: 22<7<27<6<12<26<συνθετικό<10<31<14<11< Manuka<19<23<5<2<15<1

**Πίνακας 4. Ποσοστά αναστολής σχηματισμού βιοϋμένα στο βακτήριο
*Pseudomonas aeruginosa***

Δείγματα μελιού		Συγκέντρωση 12,5 % v/v	Συγκέντρωση 6,25% v/v	Συγκέντρωση 3,125% v/v	Συγκέντρωση 1,56% v/v	Συγκέντρωση 0,78% v/v	Συγκεντρώσεις % v/v
MANUKA				(34±20) % v/v	(38±10) % v/v		Αναστολή βιοϋμένα %
ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ				(28±19) % v/v	(34±10) % v/v		Αναστολή βιοϋμένα %
1	ΡΕΙΚΙ ΚΩΝΟΦΟΡΟ			(54±7) % v/v	(30±17) % v/v		Αναστολή βιοϋμένα %
2	ΕΛΑΤΟ ΜΑΙΝΑΛΟΥ			(53±32) % v/v	(34±6) % v/v		Αναστολή βιοϋμένα %
5	ΚΟΥΜΑΡΙΑ ΚΑΙ ΡΕΙΚΙ			(46±7) % v/v	(26±13) % v/v		Αναστολή βιοϋμένα %
6	ΚΑΣΤΑΝΙΑ			(25±8) % v/v	(26±13) % v/v		Αναστολή βιοϋμένα %
7	ΠΕΥΚΟΜΕΛΟ				(24±10) % v/v	(34±11) % v/v	Αναστολή βιοϋμένα %
10	ΑΓΡΙΟΒΟΤΑΝΑ ΚΑΙ ΘΥΜΑΡΙ	(30±9) % v/v	(10±6) % v/v				Αναστολή βιοϋμένα %
11	ΚΟΥΜΑΡΙΑ			(32±21) % v/v	(40±17) % v/v		Αναστολή βιοϋμένα %
12	ΑΝΘΟΜΕΛΟ: ΠΟΛΥΚΟΜΠΟ ΚΑΙ ΚΡΟΚΟΣ			(25±15) % v/v	(23±8) % v/v		Αναστολή βιοϋμένα %
14	ΑΝΘΟΜΕΛΟ ΑΠΟ ΒΟΥΡΙΚΑ				(32±14) % v/v	(25±8) % v/v	Αναστολή βιοϋμένα %
15	ΠΟΛΥΚΟΜΠΟΣ			(54±22) % v/v	(33±5) % v/v		Αναστολή βιοϋμένα %
19	ΗΛΙΑΝΘΟΣ				(38±12) % v/v	(29±7) % v/v	Αναστολή βιοϋμένα %
22	ΘΥΜΑΡΙ: ΓΥΡΕΟΚΟΚΚΟΙ30 %			(22±7) % v/v	(22±8) % v/v		Αναστολή βιοϋμένα %
23	ΚΑΣΤΑΝΙΑ με λίγο Πεύκο				(41±28) % v/v	(27±5) % v/v	Αναστολή βιοϋμένα %
26	ΜΕΛΙ ΑΝΘΕΩΝ: ΑΓΡΙΑ ΡΙΓΑΝΗ ΚΑΙ ΑΓΡΙΟ ΤΡΙΦΥΛΛΙ			(28±9) % v/v	(18±10) % v/v		Αναστολή βιοϋμένα %
27	ΚΑΣΤΑΝΙΑ ΠΗΛΙΟ			(24±19) % v/v	(30±18) % v/v		Αναστολή βιοϋμένα %
31	ΚΟΥΜΑΡΙΑ ΜΕΛΙΒΟΙΑ			(31±14) % v/v	((29±9) % v/v		Αναστολή βιοϋμένα %

Μετά από σύγκριση των δεδομένων των πινάκων 3 και 4 παρατηρήθηκε πως γενικά η αναστολή σχηματισμού βιοϋμένα για τον κάθε τύπο μελιού είναι πιο εκτεταμένη στην

Pseudomonas aeruginosa και μπορούμε να σημειώσουμε τα εξής:

- στην συγκέντρωση 12,5% v/v εξετάστηκε το μέλι N 10 το οποίο εμφανίζει μικρή διαφορά στα ποσοστά αναστολής βιοϋμένα για το κάθε βακτήριο [(28±6) v/v% για τον *Staphylococcus aureus* και (30±9)% v/v για την *Pseudomonas aeruginosa*]. Αντίστοιχα στην συγκέντρωση 6,25% v/v εξετάστηκε το μέλι N 10 το οποίο όμως εμφανίζει εντονότερη διαφορά στα ποσοστά αναστολής του βιοϋμένα μεταξύ των δύο βακτηρίων, περίπου τριπλάσια ((33±17)% v/v για τον *Staphylococcus aureus* έναντι (10±6)% v/v για την *Pseudomonas aeruginosa*).

- στη συγκέντρωση 3,125% v/v, εξετάστηκαν τα μέλια N: Manuka, συνθετικό, 1,2,5,6,11,12,15,22,26,27,31 όπου η αναστολή σχηματισμού βιοϋμένα για τον κάθε τύπο μελιού είναι πιο εκτεταμένη στην *Pseudomonas aeruginosa*, μάλιστα σε κάποιες περιπτώσεις είναι τριπλάσια ή και περισσότερη, όπως συμβαίνει με τον τύπο μελιού 2, ή τετραπλάσια, όπως συμβαίνει με τον τύπο μελιού 1. Στις περιπτώσεις του δείγματος N26, του δείγματος N22 και του δείγματος N12 που συμβαίνει το αντίθετο, δηλαδή η αναστολή είναι μεγαλύτερη στον *Staphylococcus aureus*.

- στην συγκέντρωση 1,56% v/v εξετάστηκαν τα μέλια N: Manuka, συνθετικό, 1,2,5,6,7,11,12,14,15,19,22,23,26,27,31 όπου η εικόνα εξακολουθεί να είναι κατά προσέγγιση παρόμοια με αυτή της προηγούμενης αραίωσης, δηλαδή η αναστολή για τον κάθε τύπο μελιού είναι πιο εκτεταμένη στην *Pseudomonas aeruginosa*, αλλά η αναστολή του βιοϋμένα είναι μεγαλύτερη στον *Staphylococcus aureus* στα μέλια N: 26, 22, 12.

- στην συγκέντρωση 0,78% v/v εξετάστηκαν τα μέλια N: 7,14,19,23 όπου ο βιοϋμένας της *Pseudomonas aeruginosa* εμφανίζει υψηλότερη αναστολή, έως και πολλαπλάσια (ιδίως στον τύπο 7), σε σύγκριση με αυτές για τον *Staphylococcus aureus*, εκτός από το N14 που η αναστολή βιοϋμένα είναι υψηλότερη στην *Pseudomonas aeruginosa*.

4. Συζήτηση

Η Ελλάδα συγκαταλέγεται στις ευρωπαϊκές χώρες με τα υψηλότερα επίπεδα μικροβιακής αντοχής, ενώ είναι πρώτη στη συνολική κατανάλωση αντιμικροβιακών παραγόντων. Η ανθεκτικότητα των μικροβίων στα αντιβιοτικά θεωρείται ένα από τα πιο σοβαρά προβλήματα της δημόσιας υγείας. Οι αριθμοί των βακτηρίων που είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά έχει αυξηθεί την τελευταία δεκαετία. Πολλές βακτηριακές λοιμώξεις έχουν γίνει ανθεκτικές στις θεραπείες των πιο συχνών αντιβιοτικών. Κάθε φορά που ένα άτομο παίρνει αντιβιοτικά, τα ευαίσθητα βακτήρια σκοτώνονται, αλλά τα ανθεκτικά μικρόβια μπορεί να παραμείνουν και να πολλαπλασιαστούν. Για τα παιδιά η ανησυχία είναι ακόμα μεγαλύτερη, γιατί σε αυτά παρατηρούνται τα μεγαλύτερα ποσοστά χρήσης αντιβιοτικών. Η κατάχρηση των αντιβιοτικών θέτει σε κίνδυνο τη χρησιμότητα των φαρμάκων που είναι πραγματικά ουσιώδη και χρήσιμα. Η μείωση της αλόγιστης χρήσης των αντιβιοτικών είναι ο καλύτερος τρόπος για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας. Είναι επιτακτική ανάγκη να βρούμε εναλλακτικούς τρόπους για να καταπολεμάμε τις μολύνσεις και να στηρίζουμε το ανοσοποιητικό μας σύστημα κάθε φορά που αρρωσταίνουμε.

Ένας εναλλακτικός τρόπος αντιμετώπισης μολύνσεων είναι το μέλι. Έχει πλούσιες διατροφικές και θεραπευτικές ιδιότητες, που χρησιμοποιήθηκαν ευρέως από τον πατέρα της ιατρικής, τον Ιπποκράτη. Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού οφείλεται κυρίως στην ενζυμική παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου, μέσω του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης, της οξύτητάς του και της ώσμωσής του. Επιπρόσθετα, συστατικά του μελιού, όπως αρωματικά οξέα ή φαινολικές ενώσεις και πρωτεΐνες, συνεισφέρουν στη συνολική αντιμικροβιακή δραστηριότητα. Για πολλές εκατοντάδες χρόνια το μέλι χρησιμοποιούνταν για θεραπεία πληγών, καθώς και ως θεραπεία παθήσεων του γαστρεντερικού συστήματος. Το μέλι έχει ευρύ φάσμα δράσης κατά παθογόνων μικροοργανισμών και βακτηρίων που προσβάλλουν τον άνθρωπο και τα τρόφιμα. Έρευνες δείχνουν ότι η ισχυρή αντιβακτηριακή του δράση καθώς και η ικανότητα του να παρεμποδίζει την ανάπτυξη βακτηρίων σε μολυσμένες πληγές, καθώς και να τις καθαρίζει.

Ορισμένα είδη μελιού στις πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις καθυστερούν την ανάπτυξη του βακτηρίου, καθώς όμως αυξάνεται βαθμιαία η συγκέντρωσή τους αποκτούν βακτηριοστατική δράση και στις πολύ υψηλές συγκεντρώσεις βακτηριοκτόνο δράση. Η αντιβακτηριδιακή δράση του οφείλεται στη χαμηλή σχετικά υγρασίας του, εμποδίζοντας την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Η ισχυρή *in vitro* δράση του μελιού έναντι βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά και η επιτυχής εφαρμογή του στη θεραπεία χρόνιων μολυσμένων

πληγών που δεν ανταποκρίνονται στην αντιβιοτική θεραπεία, απέκτησε κλινική χρήση προσελκύοντας το ενδιαφέρον της ιατρικής για το μέλι ως εναλλακτική αξιόπιστη θεραπεία.

Οποσδήποτε, το μέλι ως υπέρκορο διάλυμα σακχάρων, μειώνει την ενεργότητα νερού σε επίπεδα χαμηλότερα από αυτά που απαιτούνται για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Όμως, μια ακόμη κλινική βακτηριοστατική ιδιότητα των μελιών θεωρείται πως είναι η μείωση δημιουργίας βιοϋμένων στα βακτηριακά στελέχη.

Οι βιοϋμένες αποτελούν τις κοινότητες που σχετίζονται με την επιφάνεια, όπου τα βακτήρια προτιμούν να ζουν σε αυτά. Τα βακτήρια είναι ενσωματωμένα σε μια εξωκυτταρική πολυμερική μήτρα ή πλέγμα, και προστατεύονται από περιβαλλοντικές πιέσεις, την αντιμικροβιακή θεραπεία και το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Ο σχηματισμός βιοϋμένων έχει επίσης τεκμηριωθεί ως στρατηγική επιβίωσης των παθογόνων παραγόντων δηλαδή, ορισμένοι μικροοργανισμοί μπορούν ακόμη και να διαμορφώσουν το παθογόνο δυναμικό τους στον βιοϋμένα. Ταυτόχρονα, έχει αναφερθεί ότι οι βιοϋμένες είναι λιγότερο επιρρεπείς σε αντιμικροβιακούς παράγοντες και έχουν μειωμένη ευαισθησία σε αναστολές, αυξάνοντας έτσι την επιβίωσή τους. Μεταξύ των θετικών κατά Gram βακτηρίων, ο σχηματισμός βιοϋμένων έχει μελετηθεί πιο έντονα στους σταφυλόκοκκους. Ακόμη, ο διαφοροποιημένος φαινότυπος μικροαποικιών έχει βρεθεί στους περισσότερους βακτηριακούς βιοϋμένες που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων της *Pseudomonas aeruginosa*.

Είναι χαρακτηριστικό πως οι βιοϋμένες δρουν ως ένα φράγμα διάχυσης, για να επιβραδύνουν τη διείσδυση ορισμένων αντιμικροβιακών παραγόντων. Τα ανθεκτικά κύτταρα επιδεικνύουν ανοχή σε πολλαπλά φάρμακα, όπου η ανθεκτική ανοχή επιτυγχάνεται θέτοντας «εκτός λειτουργίας» τους μικροβιακούς στόχους ή την κυτταρική ανάγκη για τους στόχους αυτούς, με τη διατήρηση μιας κατάστασης μεταβολικής ηρεμίας, προστατεύοντας έτσι το κύτταρο από ακόμη πιο βακτηριοκτόνα αντιβιοτικά.

Στην παρούσα διπλωματική μελέτη, ελέγχθηκε η αναστολή βιοϋμένα στα βακτηριακά στελέχη *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa* παρουσία ελληνικών δειγμάτων μελιού σε σύγκριση με το manuka και το συνθετικό μέλι. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν δυο σημαντικά συμπεράσματα. Πρώτον, στα δείγματα μελιού που συνολικά ήταν 15, η αναστολή βιοϋμένα είναι μεγαλύτερη στην *Pseudomonas aeruginosa* σε σχέση με τον *Staphylococcus aureus* εκτός από το δείγμα N26 στις συγκεντρώσεις 3,125% v/v και 1,56% v/v, το δείγμα N22 στην συγκέντρωση 1,56% v/v, το δείγμα N14 στην συγκέντρωση 0,78% v/v, το δείγμα N12 στην συγκέντρωση 1,56% v/v και το δείγμα N10 στην συγκέντρωση 6,25% v/v που συμβαίνει το αντίθετο. Δεύτερον, τα ελληνικά μέλια

N:1,2,5,15,19,22 εμφάνιζαν μεγαλύτερη αναστολή σε σχέση με το μέλι αναφοράς Manuka της *Pseudomonas aeruginosa*. Ταυτόχρονα, και τα 14 δείγματα μελιού εκτός του N5, εμφανίζουν μεγαλύτερη αναστολή δημιουργίας βιοϋμένα, σε σχέση με το μέλι αναφοράς Manuka του *Staphylococcus aureus*.

Εν κατακλείδι, η εύρεση εναλλακτικών θεραπειών όπως αυτή της χρήσης μελιού είναι απαραίτητες. Μια μελλοντική κατεύθυνση θα μπορούσε να είναι η ταυτόχρονη χρήση μελιού μαζί με αντιβιοτικά. Με την παρουσία μελιού, η δημιουργία βιοϋμένα των βακτηρίων αναστέλλεται, κατ' επέκταση τα αντιβιοτικά έρχονται σε καλύτερη επαφή με το βακτηριακό κύτταρο και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της ανθεκτικότητας των βακτηριακών στελεχών στα αντιβιοτικά.

5. Βιβλιογραφία

Ελληνική

- Γούναρη Σ., 2013. *Γνωρίζω τη Marchalina hellenica – το γνωστό εργάτη του πεύκου*.
- Available through: <http://www.ellinikomeli.gr/melissokomos/arxarioi-melissokomoi/850-marchalina-hellenica-ergatis-peuko>
- Θρασυβούλου Α., Μανίκης Ι., Τανανάκη Χ., Τσέλλιος Δ., Καραμπουρνιώτη Σ., Δήμου Μ., 2002. *Η ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΜΕΛΙΟΥ. Α. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΥ ΣΤΗΡΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ*. Στο: 1ο Επιστημονικό Συνέδριο Μελισσοκομίας – Σηροτροφίας. Αθήνα, 29 Νοεμβρίου – 1 Δεκεμβρίου 2002. Σελ. 1-24.
- Available through: http://beelab.agro.auth.gr/Data%20Files/Arthra/Proioda/Tautotita%20ellinikou%20meliou%202_%202013.pdf
- Κωτίκα Χ.Τ., 2012. *Το μέλι και τα συστατικά του*. [Γη Ολύμπου > Μέλι]. Available through: <http://www.geaolympou.gr/to-meli-kai-ta-systatika-tou/>
- Μυγδανάλευρος Κ., 2013. *Φθινοπωρινό ρείκι*. www.melissokomos.com
- Available through: <http://melissomania.gr/artview.php?aid=165>
- Μυγδανάλευρος Κ., 2014. *Η Κουμαριά*. www.melissokomos.com
- Available through: <http://melissomania.gr/artview.php?aid=102>
- Σάρδαλου, Γ., Μενκίσογλου-Σπυρούδη, Ο., Διαμαντίδης, Γ., Θρασυβούλου, Α., 2002. *ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΜΕΛΙΩΝ*. Στο: 1ο Επιστημονικό Συνέδριο Μελισσοκομίας – Σηροτροφίας Αθήνα, 29 Νοεμβρίου – 1 Δεκεμβρίου 2002. Σελ. 50-62.
- Available through: http://beelab.agro.auth.gr/Data%20Files/Arthra/Proioda/Tautotita%20ellinikou%20meliou%202_%202013.pdf
- Τανανάκη Χ., 2002. Ταυτότητα του μελιού. [Ελληνική Εταιρεία Εθνοφαρμακολογίας > Πρακτικά εκπαιδευτικού τριημέρου: «Τα προϊόντα της μέλισσας, από το αρχαιότερο εργαστήριο του κόσμου στην διατροφή και την υγεία» Άρτα].
- Available through: <http://www.iama.gr/ethno/arta/HoneyIdentity.pdf>
- Χήνου Β. Ι., 2006. *Μελέτη χημικών συστατικών – Βιολογικές δράσεις Ελληνικών θυμαρίσιων μελιών*. Εθνικό και Καποδιστριακό Παν/μιο Αθηνών.
- Available through: http://www.iama.gr/ethno/thymus_files/thymus_Ioanna_Xinou.pdf

Ξένη

- Adams, C.J., Boulton, C.H., Deadman, B.J., Farr, J.M., Grainger, M.N., Manley-Harris, M. and Snow, M.J., 2008. Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr Res*; 343:651–659.
- Adams, C.J., Manley-Harris, M., Molan, P.C., 2009. The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr Res*; 344:1050–1053.
- Anthimidou, E. and Mossialos, D., 2013. Antibacterial Activity of Greek and Cypriot Honeys Against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in Comparison to Manuka Honey. *JOURNAL OF MEDICINAL FOOD*. Journal of Medicinal Food. 16(1): 42-47.
- Archer, K.N., Mazaitis, J.M., Costerton, W.J., Leid, G.J., Powers, E.M. and Shirtliff, E.M., 2011. *Staphylococcus aureus* biofilms. Properties, regulation and roles in human disease. *Virulence* 2:5, 445-459; Landes Bioscience.
- Archer, L.G., 1998. *Staphylococcus aureus*: A Well-Armed Pathogen. *Clinical Infectious Diseases*;26:1179–81.
- Available through: <http://cid.oxfordjournals.org/content/26/5/1179.long>
- Bailey, T.A., Silvanose, C.D., Naldo, J.N., Howlett, J.H., 2000. *Pseudomonas aeruginosa* infections in kori bustards (*Ardeotis kori*). *Avian Pathol* 29:41-44.
- Baldassarri, L., Donnelly, G., Gelosia, A., Voglino, M.C., Simpson, A.W., and Christensen, G.D., 1996. Purification and characterization of the staphylococcal slime-associated antigen and its occurrence among *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *Infect. Immun.*, 64, 3410–3415. Available through:
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC174239/pdf/643410.pdf>
- Bowden, M.G., Visai, L., Longshaw, C.M., Holland, K.T., Speziale, P., and Höök, M., 2002. Is the GehD lipase from *Staphylococcus epidermidis* a collagen binding adhesin? *J. Biol. Chem.*, 277, 43017–43023.
- Available through: <http://www.jbc.org/content/277/45/43017.full.pdf+html>
- Biswas, R., Voggu, L., Simon, U.K., Hentschel, P., Thumm, G., and Götz, F., 2006. Activity of the major staphylococcal autolysin *Atl*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 259, 260–268.
- Available through: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.2006.00281.x/pdf>

- Bonten, M.J., Bergmans, D.C., Bonten, MJM., Bergmann, DCJJ., Speijer, H., Stobberingh, E.E., 1999. Characteristics of polyclonal endemicity of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in intensive care units. *Am J Respir Crit Care Med*;160:1212-9.
- Available through: <http://www.atsjournals.org/doi/pdf/10.1164/ajrccm.160.4.9809031>
- Brady, R.A., Leid, J.G., Kofonow, J., Costerton, J.W. and Shirtliff, M.E., 2007. Immunoglobulins to surface-associated biofilm immunogens provide a novel means of visualization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Appl Environ Microbiol*; 73:6612-9;
- Christoph, R., Schmidt, B., Steinberner, U., Dilla, W. and Karinen, R. (2006). *Glycerol*. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.
- Codex Alimentarius, 2001. *Draft revised standard for honey*. Alinorm 01/25 19-26, στο: DEFINITION AND USES OF HONEY – FAO.org, p. 81.
- Available through: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012../i0842e/i0842e10.pdf>.
- Cooper, R.A., Halas, E., Molan, P.C., 2002. The efficacy of honey in inhibiting strains of *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. *J Burn Care Rehabil*;23:366–370
- Cooper, R.A., Molan, P.C. and Harding, K.G., 2002. The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *Journal of Applied Microbiology*;93 (5):857-863).
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., and Penades, J.R., 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.*, 183, 2888–2896.
- Available through: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC99507/pdf/jb002888.pdf>
- Donlan, R.M. and Costerton, J.W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*; 15:167-93.
- Available through: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC118068/>
- von Eiff, C., Heilmann, C., Herrmann, M., and Peters, G, 1999. Basic aspects of the pathogenesis of staphylococcal polymer-associated infections. *Infection*, 27, S7–S10.
- Available through: <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02561610#page-1>
- EU Council, 2002. Council Directive 2001/11 O/EC of 20 December 2001 relating to honey. *Official Journal of the European Communities* L10, 47-52, στο: DEFINITION AND USES OF HONEY – FAO.org, p. 81.
- Available through: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012../i0842e/i0842e10.pdf>.
- Flaws, L.M. and Moore, M.N., 2011. Epidemiology and pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clinical Laboratory Science* 24.1: p43.
- Available through: <http://www.ascls.org/leadership/cls/index.asp>

- Fridkin, S.K., Hageman, J.C., Morrison, M., Sanza, L.T., Como-Sabetti, K., Jernigan, J. A., Harriman, K., Harrison, L.H., Lynfield, R., and Farley, M.M., 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. *The New England Journal of Medicine*, 352(14), 1436.
- Ghazali, F. C., 2009. Morphological characterization study of Malaysian honey - A VPSEM, EDX randomised attempt. *Ann Microscopy*, 9:93-102.
- Gohl, O., Friedrich, A., Hoppert, M. and Averhoff, B., 2006. The thin pili of *Acinetobacter* sp. strain BD413 mediate adhesion to biotic and abiotic surfaces. *Appl Environ Microbiol*;72:1394-401.
- Available through: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1392937/pdf/1975-05.pdf>.
- Gross, M., Cramton, S.E., Gätz, F., and Peschel, A., 2001. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect. Immun.*, 69, 3423–3426.
- Available through: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98303/pdf/ii003423.pdf>
- Hafiza, A. H. A., Yusof, N., Maimon, A., 2005. Potential of Malaysian local honey as an antibacterial agent. *Sains Malaysiana*, 34(1):17-20.
- Heilmann, C. and Götz, F., 2010. *Cell–Cell Communication and Biofilm Formation in Gram-Positive Bacteria*. In: Bacterial Signaling. Edited by Reinhard Krämer and Kirsten Jung 2010 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim ISBN: 978-3-527-32365-4
- Heilmann, C., Hussain, M., Peters, G., and Göz, F., 1997. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol. Microbiol.*, 24, 1013–1024.
- Available through: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2958.1997.4101774.x/pdf>
- Hern Tze Tan, Rosliza Abdul Rahman, Siew Hua Gan, Ahmad Sukari Halim, Siti Asma Hassan, Siti Amrah Sulaiman, and Kirnpal-Kaur B.S., 2009. The antibacterial properties of Malaysian tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to manuka honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2009, 9:34.
- Jabra-Rizk, M.A., Meiller, T.F., James, C.E. and Shirliff, M.E., 2006. Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*;50:1463-9.
- Available through: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1426993/pdf/1594-05.pdf>
- Jenkins, R. and Cooper, R. (2012). Improving antibiotic activity against wound pathogens with manuka honey in vitro. *PLoS One*, 7(9):e45600.
- Available through: <http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0045>

- Karlowsky, J.A., Jones, M.E., Draghi, D.C., Thornsberry, C., Sahm, D.F., and Volturo, G.A., 2004. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of bacteria isolated from blood cultures of hospitalized patients in the United States in 2002. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 3, 7.
- Available through: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC420484/pdf/1476-0711-3:7.pdf>
- Khan, M.O., Montecalvo, M.A., Davis, I. and Wormser, G.P., 2000. Ecthyma gangrenosum in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Cutis* 66:121-123.
- Kwakman, P.H., te Velde, A.A., de Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls C.M. and Zaat S.A., 2010. How honey kills bacteria. *FASEB J*;24:2576–2582
- Kwakman, H.S. P., Velde, A. A., de Boer, L., Vandenbroucke-Grauls, C. M.J.E. and Zaat, S. A.J., 2011. Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity. *PLoS ONE* 6(3): e17709. doi:10.1371/journal.pone.0017709.
- Le Loir, Y., Baron, F., and Gautier, M., 2003. Staphylococcus aureus and food poisoning. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 2(1), 63-76.
- Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., and Laufs, R., 1996. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of Staphylococcus epidermidis is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.*, 178, 175–183.
- Available through: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC177636/pdf/1780175.pdf>
- Mavric, E., Wittmann, S., Barth, G. and Henle, T., 2008. Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (Leptospermum scoparium) honeys from New Zealand. *Mol Nutr Food Res*; 52(4): 483–489.
- Mundo, M.A., Padilla-Zakour, O.I. and Worobo, R.W., 2004. Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *Int J Food Microbiol*; 97:1–8.
- Nikaido, H. (2009). *The Limitations of LB Medium*. Small things considered. The Microbe Blog. ASM.
- Available through: <http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2009/11/the-limitations-of-lb-medium.html>
- Obritsch, M.D., Fish, D.N., MacLaren, R. and Jung, R., 2004. National surveillance of antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa isolates obtained from intensive care unit patients from 1993 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother*;48:4606-10.
- Available through: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC529178/pdf/0007-04.pdf>
- Parsonnet, J., Hansmann, M.A., Delaney, M.L., Modern, P.A., DuBois, A. M., Wieland-Alter, W.,

- Wisseman, K.W., Wild, J. E., Jones, M.B., and Seymour, J.L., 2005. Prevalence of toxic shock syndrome toxin 1-producing *Staphylococcus aureus* and the presence of antibodies to this superantigen in menstruating women. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9), 4628.
- Public Health Agency of Canada, 2012. *STAPHYLOCOCCUS AUREUS. PATHOGEN SAFETY DATA SHEET - INFECTIOUS SUBSTANCES*.
 - Available through: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/staphylococcus-aureus-eng.php>
 - Qarah, S., Cunha, B.A., Dua, P., Lessnau, K.-D., 2013. *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Medscape*. Updated: Aug 16, 2013.
 - Available through: <http://emedicine.medscape.com/article/226748-overview>.
 - Rahme, L.G., Ausubel, F.M., Cao, H., Drenkard, E., Goumnerov, B.C., Lau G.W., Mahajan-Miklos, S., Plotnikova, J., Tan, M.W., Tsongalis, J., Walendziewicz, C.L. and Tompkins, R.G., 2000. Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8815-8821.
 - van Rijen, M.M., Bonten M., Wenzel, R.P. and Kluytmans, J.A., 2008. Intranasal mupirocin for reduction of *Staphylococcus aureus* infections in surgical patients with nasal carriage: a systematic review. *J Antimicrob Chemother*;61:254-61.
 - Available through: <http://jac.oxfordjournals.org/content/61/2/254.full.pdf+html>
 - Santas, L., 1983. Insects producing honeydew exploited by bees in Greece. *Apidologie* 14(2):93-103.
 - Santas, L., 1988. *Physokermes hemicryphus* (Dalman) a fir scale insect useful to apiculture in Greece. *Entom. Hellenica* 6:11-22.
 - Sauer, K., Camper, K.A., Ehrlich, D.G, Costerton, W.J., and Davies, G.D., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* 184:1140–1154.
 - Available through: <http://jb.asm.org/content/184/4/1140.full.pdf+html>
 - Sawhney, R., Berry, V., 2009. Bacterial biofilm formation, pathogenicity, diagnostics and control: An overview. *Indian J Med Sci*;63:313-21.
 - Sherlock, O., Dolan, A., Athman, R., Power, A., Gethin, G, Cowman, S. and Humphreys, H., 2010. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2010, 10:47 .
 - Singh, R., Ray, P., Das, A. and Sharma, M., 2010. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Antimicrob Chemother*; 65:1955-8.
 - Available through: <http://jac.oxfordjournals.org/content/65/9/1955.full.pdf+html>

- Spoering, A.L. and Lewis, K., 2001. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol*; 183:6746-51.
- Available through: <http://jb.asm.org/content/183/23/6746.full.pdf+html>
- Waters, C.M. and Bassler, B.L., 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 21, 319–46.
- Available through:
http://andrew-michaelson.com/Genetics/AdditionalPaperstoRead/Regulation_Reading/Dec20/1.pdf
- Watnick, P. and Kolter, R., 2000. Biofilm, City of Microbes. *J. Bacteriol.* vol. 182 no. 10 2675-267. Available through: <http://jb.asm.org/content/182/10/2675.full>
- Webb, S.J., Thompson, S.L., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M., and Kjelleberg, S., 2003. Cell Death in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, p. 4585–4592 Vol. 185, No. 15.
- Weston, R.J., 2000. The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review, *Food Chem* 71.
- Zumla, A., Lulat, A., 1989. Honey-a remedy rediscovered. *J R Soc Med*;82:384–385.